



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Química e Ingeniería Química
Escuela Profesional de Ingeniería Química

Modelamiento matemático de la fenomenología de crecimiento de *pseudomonas putida* a partir de la cinética utilizando glicerol como sustrato

TESIS

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico

AUTOR

Alvaro Enrique QUINTEROS SEDANO

ASESOR

Ruben Alfredo PALOMINO INFANTE

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Quinteros, A. (2018). Modelamiento matemático de la fenomenología de crecimiento de pseudomonas putida a partir de la cinética utilizando glicerol como sustrato. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Ingeniería Química]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú, Decana de América

Facultad de Química e Ingeniería Química

Central: 6197000 anexo 1208

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para mujeres y hombres"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TÍTULO POR TESIS

Los suscritos Miembros del Jurado, nombrado por la Sra. Directora de la Escuela Profesional de Ingeniería Química, bajo la Presidencia del **Dr. WALDIR DESIDERIO ESTELA ESCALANTE** (Presidente), el **Dr. RAYMUNDO ERAZO ERAZO** (Miembro), y el **Dr. ALFREDO PALOMINO INFANTE** (Asesor), después de escuchar la sustentación de la **TESIS**, titulada: **"MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LA FENOMENOLOGÍA DE CRECIMIENTO DE PSEUDOMONAS PUTIDA A PARTIR DE LA CINÉTICA UTILIZANDO GLICEROL COMO SUSTRATO"**, rendido por el Bachiller en Ingeniería Química **ALVARO ENRIQUE QUINTEROS SEDANO**; para optar el **TÍTULO PROFESIONAL** de **INGENIERO QUÍMICO**. Acordaron calificarle con la **NOTA** de:

DIECIOCHO (18:0)
(LETRAS)

(NUMEROS)

Ciudad Universitaria, 29 de Agosto de 2018.

Dr. WALDIR DESIDERIO ESTELA ESCALANTE
PRESIDENTE

Dr. RAYMUNDO ERAZO ERAZO
MIEMBRO

Dr. ALFREDO PALOMINO INFANTE
ASESOR

Mg. JUANA SANDIVAR ROSAS
Directora de la Escuela Profesional
de Ingeniería Química

AGRADECIMIENTOS

En todo este tiempo de duro trabajo y muchas frustraciones ha habido personas que me han apoyado y guiado a lo largo del tortuoso trayecto que significa un trabajo como este. Por eso, mi sincero agradecimiento a:

Al profesor Alfredo Palomino, por su amistad, atención, confianza y sabia guía, fruto de una larga experiencia profesional y científica, cualidades que, sin lugar a dudas, hacen de él un excelente maestro y persona. Está de más decir que sin lo ya mencionado todo este trabajo hubiera sido imposible de realizar.

Al profesor Juan Carlos Woolcott, por su apoyo, disponibilidad y tutoría especializada permanente durante el experimento, aunado a sus cualidades personales y gran experiencia científica en ciencias biológicas, motivo por el cual forjamos una buena amistad.

A los profesores Héctor Gómez y Raymundo Erazo, por su amabilidad y enorme disposición a ayudarme desde el comienzo de este trabajo en la medida de sus posibilidades.

A mis amigos de base, con los que compartí muchos momentos inolvidables a lo largo de mi estadía en San Marcos y entablé una relación muy sólida, quizá no desde el comienzo, pero muy valiosa. Tengo la certeza de que nuestra amistad perdurará.

A mis amigos del colegio con los que compartí una etapa muy importante de mi vida y con los que aun ahora me reúno eventualmente. Especialmente a Luis Suárez Su, amigo y hermano sanmarquino, que me brindó apoyo con la obtención de un reactivo muy importante.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, mi adorada alma máter, en especial a la Facultad de Química e Ingeniería Química, que, a pesar de las deficiencias y dificultades, sentó la base de mi educación científica. Les aseguro que siempre intentaré dejar en alto su nombre.

A Huacho, mi tierra querida, que me acogió desde que llegué y que aún me espera cada fin de semana.

A mis padres, mi hermana y familiares, por brindarme siempre el amor y calor de hogar.

Dedicatoria

A mis amados padres, Julio y Betty, y a mi hermana, Ariana, muchas gracias por su apoyo durante todo este tiempo, por formarme, por sus sacrificios continuos y por hacer de mí un hombre de bien mientras el destino me conduce en esta aventura.

ÍNDICE.....	i
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
RÉSUMÉ	vii
ACRÓNIMOS.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	2
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA	4
1.1. CONCEPTOS GENERALES	5
1.1.1. Microbiología.....	5
1.1.2. Biotecnología	5
1.1.3. Tipos de metabolismo	6
1.1.4. <i>Pseudomonas putida</i>	7
1.2. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA.....	8
1.2.1. Crecimiento bacteriano	9
1.2.2. Modelos predictivos	16
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.1. CEPA UTILIZADA	22
2.2. MATERIALES	22
2.3. METODOLOGÍA	22
2.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	23
2.4.1. Reactivación del microorganismo	23
2.4.2. Preparación de las muestras	24

2.4.3.	Determinación de crecimiento.....	25
2.4.4.	Determinación de concentración de glicerol remanente	26
CAPÍTULO III. FORMULACIÓN DE MECANISMO Y GENERACIÓN DEL MODELO CINÉTICO.....		28
3.1.	MECANISMO CINÉTICO PSEUDOMOLECULAR	29
3.2.	CÁLCULOS CINÉTICOS	37
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS		39
4.1.	PARÁMETROS CINÉTICOS	40
4.2.	CONCENTRACIÓN DE GLICEROL.....	44
4.3.	BIOMASA.....	47
4.4.	COMPARACIÓN ENTRE MODELOS	53
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		61
ANEXOS		68

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figuras

<i>Figura 1.</i> Biosíntesis de PHA en el contexto del metabolismo microbiano utilizando 3 rutas alternas.....	8
<i>Figura 2.</i> Curva de crecimiento típica de los microorganismos.....	10
<i>Figura 3.</i> Relación entre la temperatura y las velocidades de crecimiento de microorganismos diferentes.....	13
<i>Figura 4.</i> Curva típica de la raíz cuadrada de la constante de crecimiento específico vs. la temperatura.....	14
<i>Figura 5.</i> Crecimiento total de E. Coli en un medio sintético con sustrato orgánico (manitol) como factor limitante.....	15
<i>Figura 6.</i> Esquema general de modelos metabólicos para <i>Saccharomyces cerevisie</i>	17
<i>Figura 7.</i> Representación de un modelo bi-compartimentado para fermentación de ácido láctico.....	18
<i>Figura 8.</i> Representación de un modelo tri-compartimentado en el cual suceden reacciones químicas de formación de biomasa (R), síntesis de proteínas (G) y transcripción del RNA (K)...	18
<i>Figura 9.</i> Modelo de célula para el crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> empleando glucosa como sustrato.	19
<i>Figura 10.</i> Ampolla de <i>Pseudomonas putida</i> liofilizada.	22
<i>Figura 11.</i> Solución madre, pre-inóculo de <i>Pseudomonas putida</i>	25
<i>Figura 12.</i> Solución madre y muestras experimentales.	26
<i>Figura 13.</i> Espectrofotómetro GENESYS 20.	26
<i>Figura 14.</i> Cubetas con muestras antes de ser introducidas al espectrofotómetro.	27
<i>Figura 15.</i> Tubos de ensayo con muestras remanentes luego de las lecturas.	27
<i>Figura 16.</i> Velocidad máxima de crecimiento específica (10 g/l sustrato).	42
<i>Figura 17.</i> Velocidad máxima de crecimiento específica (20 g/l sustrato).	43
<i>Figura 18.</i> Velocidad máxima de crecimiento específica (30 g/l sustrato).	43
<i>Figura 19.</i> Tiempo de latencia (10 g/l sustrato).	43
<i>Figura 20.</i> Tiempo de latencia (20 g/l sustrato).	44
<i>Figura 21.</i> Tiempo de latencia (30 g/l sustrato).	44
<i>Figura 22.</i> Curva de patrones de glicerol.	45
<i>Figura 23.</i> Curva de consumo de glicerol para el escenario 1.	46
<i>Figura 24.</i> Curva de consumo de glicerol para el escenario 2.	46

<i>Figura 25.</i> Curva de consumo de glicerol para el escenario 3.	47
<i>Figura 26.</i> Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> (Concentración de sustrato inicial 10 g/l).	48
<i>Figura 27.</i> Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> (Concentración de sustrato inicial 20 g/l).	49
<i>Figura 28.</i> Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> (Concentración de sustrato inicial 30 g/l).	49
<i>Figura 29.</i> Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> empleando el modelo logístico.	51
<i>Figura 30.</i> Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> empleando el modelo de Gompertz.	51
<i>Figura 31.</i> Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> empleando el modelo de Baranyi.	52
<i>Figura 32.</i> Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> empleando el modelo de estudio.	52
<i>Figura 34.</i> Serie de Taylor comparativa (concentración de sustrato inicial 10 g/l).	55
<i>Figura 35.</i> Serie de Taylor comparativa (concentración de sustrato inicial 20 g/l).	55
<i>Figura 35.</i> Serie de Taylor comparativa (concentración de sustrato inicial 30 g/l).	56

Tablas

<i>Tabla 1.</i> Relaciones C/N.	16
<i>Tabla 2.</i> Composición del medio de cultivo.	23
<i>Tabla 3.</i> Composición de los medios de cultivo.	24
<i>Tabla 4.</i> Escenarios de ensayo	38
<i>Tabla 5.</i> Parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo logístico.....	41
<i>Tabla 6.</i> Parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo de Gompertz.....	41
<i>Tabla 7.</i> Parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo de Baranyi.	42
<i>Tabla 8.</i> Parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo de estudio.	42
<i>Tabla 9.</i> Valores de Se para los modelos cinéticos.	53

RESUMEN

Esta investigación se enfoca a desarrollar una ecuación que describa el crecimiento en biomasa de *Pseudomonas putida* utilizando glicerol como fuente de sustrato, asumiendo desde el principio, una serie de reacciones bioquímicas que, en conjunto, establecen un mecanismo que detalla la fenomenología de crecimiento del microorganismo en cuestión almacenando un biopolímero en su interior.

Desde el punto de vista biológico, el crecimiento de los microorganismos se da en etapas perfectamente diferenciables, por lo que la matemática detalla todo este proceso por medio de ecuaciones empíricas. Estas ecuaciones carecen de sustento bioquímico, por lo que un análisis fenomenológico (empleando la cinética química) de lo que sucede dentro del sistema explicaría (con mejor aproximación) los procesos involucrados.

Los resultados del cultivo de *Pseudomonas putida* con glicerol como sustrato revelaron que al variar su concentración entre 10 y 30 g/l en el medio, el crecimiento de la bacteria es muy variable; esto fue corroborado mediante el ajuste de los datos obtenidos experimentalmente con los modelos cinéticos logístico, de Gompertz, de Baranyi y el obtenido al desarrollar el mecanismo cinético propuesto. El modelo que mejor describe el crecimiento de la bacteria es el de Baranyi; esto se evidenció gracias a la desviación estándar entre los valores experimentales y los ajustados. Asimismo, el modelo logístico y experimental mostraron los mismos parámetros cinéticos; esto sugiere que la cinética planteada en el mecanismo sustenta el modelo logístico. Ambos modelos fueron comparados utilizando la serie de Taylor y evaluadas con un nivel de significancia $p=0.05$; aun así, no reflejaron diferencias significativas.

En conclusión, la ecuación resultante del mecanismo cinético propuesto representa a la del modelo logístico, motivo por el cual otorga sustento bioquímico a una ecuación empírica, resultante de suposiciones netamente matemáticas.

ABSTRACT

This research focuses on developing an equation that describes the *Pseudomonas putida* biomass growth using glycerol as carbon source supposing, from the beginning, a series of biochemical reactions establishing a mechanism that details the growth phenomenology of microorganism storing a biopolymer.

From the biological point of view, the growth of the microorganisms is given in perfectly distinguishable stages, whereas the mathematics details all this process through mathematical equations. For lack of biochemical support, a phenomenological analysis (using the kinetic chemistry) of what happens inside the system would explain the overall process.

The culture results of *Pseudomonas putida* with glycerol revealed that exists a variable bacterial growth changing the concentration of carbon source between 10 a 30 g/l; this was corroborated by means of the fitting of the experimental data to several kinetics models (logistic, Gompertz and Baranyi) and the kinetic model obtained by the proposed mechanism.

The model which better describes the growth of the bacterium is Baranyi's model; this was demonstrated through the standard deviation between the experimental values and the exact ones. Furthermore, the logistic and experimental model, they showed the same kinetic parameters; this suggest that the logistic model is supported by the kinetic model raised by the proposed mechanism. Both models were compared using the Taylor series, even this way they did not reflect significant differences.

In conclusion, the resultant equation of the kinetic proposed mechanism represents the logistic model, for that reason a biochemical support is given to an empirical model which was obtained by mathematical suppositions.

RÉSUMÉ

Cette recherche s'agit à développer une équation qui décrit la croissance en biomasse de *Pseudomonas putida* en utilisant glycérol comme substrat en supposant, dès le début, une série de réactions biochimiques qui, toutes ensemble, établissent un mécanisme détaillant la phénoménologie de la croissance du microorganisme dont on parle et qui garde du biopolymère à son intérieur.

D'un point de vue biologique, la croissance des microorganismes progresse-t-elle dans étapes parfaitement différenciées, tandis que la mathématique détaille tout le processus au moyen d'équations empiriques. Ces équations manquent de soutien biochimique, raison pour laquelle une analyse phénoménologique (en utilisant la cinétique chimique) du système exprimerait (en détail) les procès concernés.

Les issues de cultiver des *Pseudomonas putida* avec glycérol ont révélé qu'au moment de changer la concentration du substrat dans le milieu (de 10 à 30 g/l), la croissance de la bactérie en varie beaucoup ; alors, elle a été vérifiée grâce à l'ajustement des données aux modèles logistique, de Gompertz, de Baranyi et celui obtenu expérimentalement issu du mécanisme proposé. Le modèle qui a mieux décrit la croissance de la bactérie est-il celui de Baranyi ; cela a été vérifié grâce à la déviation standard parmi les données expérimentales et ceux ajustés. En outre, le modèle logistique et celui expérimental ont affiché paramètres cinétique pareils ; cela suggère que le mécanisme cinétique proposé soutient le modèle logistique. Tous les deux modèles ont été comparés en utilisant la série de Taylor et ils n'ont pas quand même montré de différences significantes.

Pour conclure, l'équation issue du mécanisme proposé représente-elle au modèle logistique, raison pour laquelle on a octroyé du soutien biochimique à une équation empirique issue de suppositions mathématiques.

ACRÓNIMOS

A_s	Parámetro de capacidad del sistema
ADP	Adenosín di-fosfato
ATP	Adenosín tri-fosfato
ATCC	American type culture collection
a_w	Actividad del agua
BFR	Biofilm reactor
CoA	Coenzima A
DFE	Grados de libertad para el error
DNA	Deoxyribonucleic acid
EE	Error estándar
GL	Grados de libertad
IC	Intervalo de confianza
MSE	Cuadrado medio del error
N_0	Concentración inicial de células
nm	Nanómetro
OD	Oxígeno disuelto
P_E	Producto extracelular
PHA	Poli-hidroxialcanoato
RNA	Ribonucleic acid
RPM	Revoluciones por minuto
S_e	Desviación estándar entre los valores experimentales y los ajustados
S_F	Sustrato re-convertido
SSE	Suma del cuadrado de residuos
TCA	Tri carboxylic acid
t_g	Tiempo de generación
ufc	Unidades formadoras de colonias
μ_{max}	Velocidad máxima de crecimiento específica
UV	Ultravioleta
X_M	Biomasa

X_F	Biomasa con biopolímero
XS	Complejo biomasa-sustrato
XP	Complejo biomasa-producto
y_{\max}	Límite máximo del \ln de la concentración de biomasa
y_{\min}	Límite mínimo del \ln de la concentración de biomasa
$Y_{x/s}$	Conversión del sustrato

INTRODUCCIÓN

Un estudio cinético profundo de una reacción química brinda datos muy importantes en ingeniería. En ingeniería química, la principal relevancia que se le da a este tema es durante el diseño de un reactor; escoger, dimensionar y determinar las condiciones óptimas de operación son condicionadas por la ingeniería de las reacciones químicas (Davis y Davis, 2003), la cual está basada en la cinética.

Por otro lado, la cinética no solo ofrece la posibilidad de analizar las reacciones química y sus mecanismos, también cumple un papel fundamental durante el estudio de crecimiento de microorganismos. El modelamiento matemático del crecimiento de estos microorganismos es abordado por la microbiología predictiva. Autores como Augustin y Carlier (2000) han realizado investigaciones sobre diversos microorganismos, principalmente para obtener modelos globales que describan el efecto del ambiente sobre los parámetros de crecimiento de estos microorganismos; estos micro entes cumplen roles fundamentales en la biotecnología moderna según los productos que sintetizan, ya sean intra o extracelulares.

La predisposición de un microorganismo a producir determinada sustancia está codificada en sus genes (Castillo, 2008), esto, aunado a una ruta metabólica predeterminada, favorece la síntesis del ansiado producto. Si bien esto tiene una connotación netamente biológica, también podría ser representada mediante un mecanismo cinético químico, lo cual desembocaría en una ecuación matemática que describa el comportamiento de un microorganismo en un medio determinado. Dicha ecuación matemática podría ser interpretada como un modelamiento de la formación de un producto o del crecimiento del mismo ente biológico (Zwietering, Jongenburger, Rombouts y Van't Riet, 1990).

Los fenómenos que suceden dentro de la célula son muy conocidos en bioquímica; no obstante, su interpretación netamente química podría ser resumida agrupando un conjunto de reacciones catabólicas o anabólicas. Si se pudiera proponer o identificar un mecanismo que explique el proceso de la formación de un producto o el crecimiento de la biomasa, podría otorgar sustento químico a los modelos empíricos, obtenidos con base en suposiciones matemáticas.

HIPÓTESIS

➤ Hipótesis general

- ✓ Es posible predecir la velocidad de crecimiento específica en biomasa de *Pseudomonas putida* a partir de la solución matemática de un mecanismo cinético bioquímico propuesto.

❖ Hipótesis específicas

- ✓ La etapa limitante en el mecanismo bioquímico consiste en la formación del complejo que precede a la síntesis del biopolímero.
- ✓ El mecanismo cinético químico puede expresar cada una de las etapas del crecimiento de *Pseudomonas putida*.
- ✓ Los parámetros de crecimiento cinético pueden ser obtenidos de la solución matemática del mecanismo cinético químico utilizando el cálculo diferencial.

OBJETIVOS

Tomando en cuenta que para este estudio de la cinética microbiana se ha utilizado como base la cinética química, para postular un mecanismo de reacción bioquímica capaz de aportar las nociones básicas de los fenómenos que ocurren dentro del microorganismo estudiado, se ha realizado el presente trabajo con los objetivos siguientes:

➤ **Objetivo general**

Desarrollar una ecuación de velocidad que describa el crecimiento en biomasa de *Pseudomonas putida* utilizando glicerol como fuente de sustrato.

❖ **Objetivos específicos**

- Detallar la fenomenología del crecimiento de *Pseudomonas putida* sobre glicerol a partir de los parámetros cinéticos de la ecuación de velocidad obtenida.
- Obtener los parámetros cinéticos del crecimiento de *Pseudomonas putida* a partir de la ecuación de velocidad obtenida.
- Establecer una comparación cuantitativa entre los parámetros cinéticos obtenidos de la ecuación de velocidad obtenida y los modelos cinéticos existentes.

CAPÍTULO I.

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. CONCEPTOS GENERALES

1.1.1. Microbiología

Para adentrarse al mundo de las bacterias es necesario saber que no solo ellas habitan el mundo microscópico. De hecho, existen otros microorganismos como los hongos, protistas, virus y priones que coexisten en ese mundo. Cabe resaltar que muchos autores, entre ellos Lodish et al. (2005) no consideran a los virus como seres vivos puesto que, para poder crecer, reproducirse o sobrevivir deben infectar una célula para posteriormente sintetizar proteínas y replicar su material genético.

La microbiología trata de células y de cómo funcionan, en especial de las bacterias y levaduras. La microbiología estudia la diversidad y la evolución, el modo en que surgieron los diferentes tipos de microorganismos y el porqué. Analiza lo que los microorganismos hacen en la naturaleza, en los suelos y en las aguas, en el cuerpo humano, en los animales y en las plantas. (Madigan, Martinko, Dunlap y Clark, 2009).

1.1.2. Biotecnología

La ciencia avanza y nuevos retos aparecen, tales como lidiar con la ingente cantidad de recursos que necesita la población mundial para subsistir, desarrollar nuevas tecnologías para los procesos químicos, la producción de antibióticos y medicamentos para paliar o contrarrestar las enfermedades, etc. ¿Cómo disminuir el tiempo de siembra y de cosecha de frutas y verduras? ¿Habrá alguna manera para mejorar la eficiencia productiva del ganado? ¿Sintetizar antibióticos o buscar un agente sintetizador natural? Las respuestas a estas interrogantes son las siguientes: En respuesta a la primera pregunta, se ha logrado con éxito la transferencia de genes que confieren resistencia al glifosato, un agente inhibidor del crecimiento de la mayor parte de plantas de cultivo, esto ha permitido que los granjeros (desde mediados de 1990) tengan un mejor control de los cultivos de algodón (Mathews, Van Holde y Ahern, 2002). El desarrollo y modernización de los procesos es fundamental para el progreso de la ingeniería, por ejemplo, para la fabricación de papel y tejidos a partir de madera se está empleando hongos que secretan una enzima capaz de degradar la lignina, así se reduce la polución química emitida durante el proceso (Mathews et al., 2002). En respuesta al déficit

de medicinas y antibióticos se logró producir insulina, interferones, somatotropina y muchas otras hormonas gracias a técnicas de DNA recombinante e ingeniería genética (Bolívar, 2007).

1.1.3. Tipos de metabolismo

En la actualidad la búsqueda de nuevas tecnologías que permitan el desarrollo de procesos mucho menos nocivos con el medio ambiente es fundamental para la ciencia moderna, en especial para la biotecnología. Desde hace algunos años la optimización de recursos y energía es un tema de interés para los investigadores; ellos han ido explorando nuevas alternativas y medios en los cuales desarrollar los ansiados productos, estos varían desde sustancias muy sencillas como etanol o ácido acético, hasta complejas estructuras tal como las enzimas, proteínas y antibióticos. La respuesta siempre estuvo ante nuestros ojos, aunque no los podamos ver: los microorganismos.

Estos diminutos seres vivos tienen el mismo ciclo de vida que nosotros los humanos, sin embargo ¿cómo unos diminutos cuerpos con estructura bioquímica más simple que la de nosotros puede cumplir con nuestras expectativas de sintetizar complejas sustancias? Hay que decir que no solo hay un tipo de microorganismo, ¡hay miles de ellos! Entre la multitud y sus rutas metabólicas podemos buscar lo que necesitamos, ya sea una estructura molecular compleja o muy simple.

Antes de continuar hablando con detalle de qué y cómo pueden ayudarnos estos microorganismos hay que especificar los tipos de metabolismo que ellos experimentan, recalcando que algunos de estos pueden ser provechosos y otros nocivos de algún modo; hay dos tipos:

a) Metabolismo primario: Este es el más básico y necesario para su subsistencia. Se origina durante el crecimiento exponencial de los microorganismos y proporciona a la célula energía y macromoléculas imprescindibles para su constitución celular, como proteínas, polímeros estructurales y el mismo DNA gracias a una serie de reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas (Roussos y Perraud-Gaime, 1996). Sustancias tales como ácidos orgánicos, alcoholes y algunas enzimas pueden ser obtenidas de este metabolismo.

b) Metabolismo secundario: Es la marca distintiva entre los microorganismos. Pueden ser catalogado como su mecanismo de defensa o su arma contra seres hostiles; se desarrolla durante la etapa estacionaria del crecimiento. Alcaloides, terpenos y antibióticos como la penicilina o la cefalosporina son algunas de las sustancias de mayor interés que se generan como metabolitos secundarios (Roussos y Perraud-Gaime, 1996).

1.1.4. *Pseudomonas putida*

Las *Pseudomonas* son bacterias gram¹ negativas muy versátiles gracias a su adaptabilidad a todo tipo de medios (pueden ser aisladas en suelos, aguas, alimentos y hasta en algunas plantas y animales) y requerimientos nutricionales muy simples (Mayz y Manzi, 2007). Hay que resaltar que también son muy reconocidas gracias a la heterogeneidad de sus rutas metabólicas, las cuales tienen un alto potencial de estudio biotecnológico, pudiendo aportar a áreas como la biodegradación, biocatálisis, biocontrol y producción de biopolímeros (Fernández, 2012).

Para el presente estudio nos centraremos en la producción de bioplásticos esencialmente. Liu, Luo, Zhou y Chen (2011) afirman que las *Pseudomonas putida* producen biopolímeros de tipo polihidroxialcanoatos de cadena media; estos polímeros tienen como unidades fundamentales (monómeros) 3-hidroxialcanoatos de cadenas desde 6 a 14 carbonos. Liu et al. (2011) encontraron que la bacteria en cuestión contiene enzimas encargadas de la β -oxidación de ácidos grasos codificada en sus genes y que su inhibición durante el crecimiento celular podría sintetizar poli-3-hidroxidecanoato (PHD).

El detalle de la formación del biopolímero no será abordado con detenimiento durante este trabajo, puesto es que solo referencial para el objetivo de este; sin embargo, Shankar, D'Souza, Narvekar, Rao y Tembadmani (2015) explican de manera concisa este proceso:

¹ Es un tipo de tinción diferencial desarrollada por el danés Has Christian Gram en 1884. El resultado negativo a la prueba indica que la pared celular está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa; por otro lado, el resultado positivo denota que la pared celular es gruesa, pero no se cuenta con membrana celular externa (López et al, 2014).

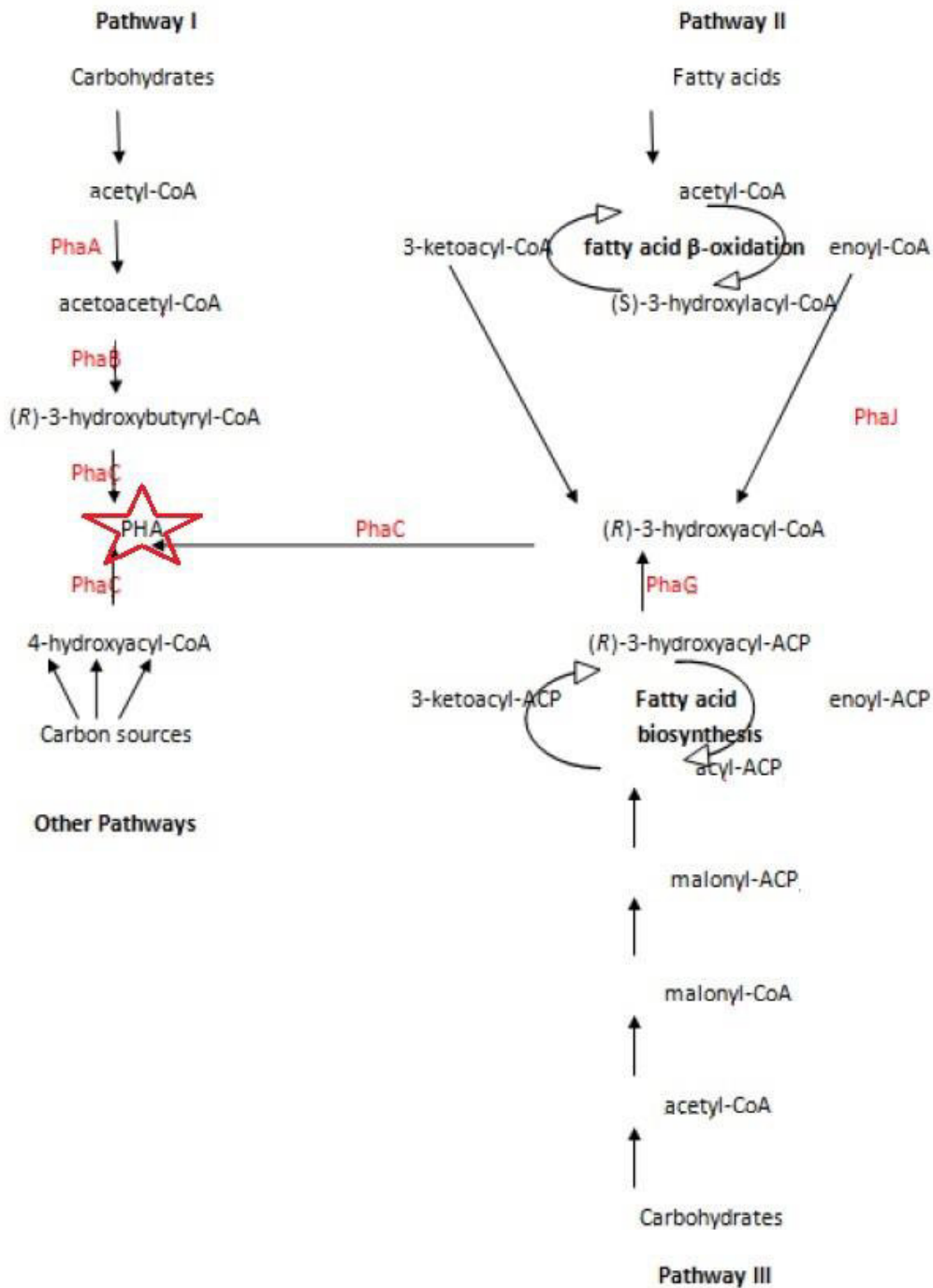


Figura 1. Biosíntesis de PHA en el contexto del metabolismo microbiano utilizando 3 rutas alternas.
Fuente: Shankar et al. (2015)

1.2. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA

Si bien este término es utilizado con frecuencia en el ámbito de seguridad alimentaria y calidad de alimentos, es necesario introducirlo para evaluar cómo un microorganismo se desarrolla en un ambiente que le garantice las condiciones óptimas de pH, humedad y alimento (sustrato) para su crecimiento; como respuesta a estas condiciones la

cantidad de microorganismos en el medio va a aumentar y podríamos predecir su comportamiento matemáticamente (Dos Santos, 2007).

El gran éxito de la microbiología predictiva radica en que al estudiar el comportamiento (en este caso) bacteriano bajo factores bio-físico-químicos – llamaremos a esto fase de observación – podríamos predecir la futura respuesta del mismo tipo de microorganismo – etapa a la cual llamaremos fase predictiva – en un ambiente similar gracias al desarrollo de ecuaciones matemáticas (Fakruddin, Mazumder y Bin Mannan, 2011).

Antes de detallar las ecuaciones matemáticas desarrolladas empíricamente que recrean el comportamiento de diversos microorganismos en condiciones específicas es necesario aclarar las fases del crecimiento microbiano.

1.2.1. Crecimiento bacteriano

1.2.1.1. Etapas de crecimiento

- i. Lag o latencia:* Es la fase inicial o de adaptación. Los microorganismos presentan un crecimiento o inactivación menor al 3% respecto a las células inoculadas²; la adaptación de las células se lleva a cabo mientras las células modifican el medio (Albornoz, 2015).
- ii. Crecimiento exponencial:* Durante esta etapa se evidencia un rápido crecimiento de la población y a un ritmo constante. El microorganismo alcanza el ápice de su desarrollo (Pérez y Silveira, 2007).
- iii. Estacionaria:* El número de células de la población permanece, aparentemente, inamovible; sin embargo, el número de células que se originan es igual al de las que mueren debido a la escasez de factores crecimiento, nutrientes en el medio y la saturación de este (Pérez y Silveira, 2007).
- iv. Muerte:* El equilibrio entre células que nacen y mueren, se rompe, ya que el número de estas últimas es mayor. La vida se hace insostenible a causa de la falta de nutrientes y las sustancias tóxicas del medio (Pérez y Silveira, 2007).

² Inóculo se refiere a los microorganismos transferidos a un medio huésped (sea biótico o abiótico) en el cual crecerá, se reproducirá y se desarrollará de modo variable según los factores bio-físico-químicos intrínsecos de dicho medio.

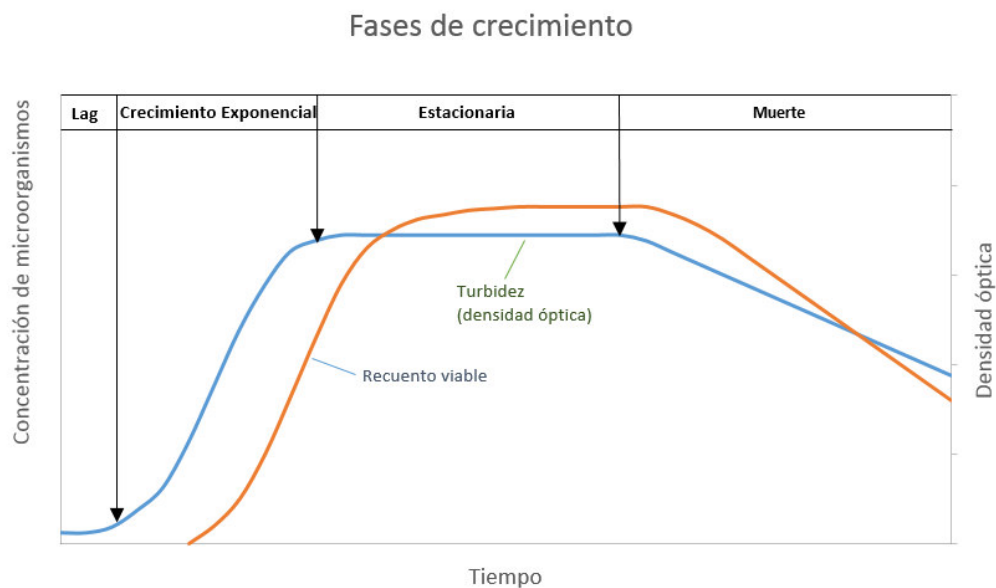


Figura 2. Curva de crecimiento típica de los microorganismos.
Fuente: Adaptación de Madigan et al. (2009)

1.2.1.2. Tiempo de generación

Es el tiempo requerido para que el número de células se duplique. Es variable entre todos los microorganismos; puede variar desde algunos días hasta varias horas. Normalmente, su aplicación radica en corroborar la acción de un agente o sustancia dentro del medio de cultivo (Dos Santos, 2007).

Para un cálculo rápido de esta, Madigan et al. (2009) presenta la siguiente ecuación:

$$t_g = 3.3(\log N - \log N_0) \quad (1.1)$$

Donde:

t_g representa el tiempo de generación

N representa el número final de células

N_0 representa el número inicial de células

1.2.1.3. Velocidad de crecimiento

Es la tasa de incremento del número de células microbianas en una población (ufc/unidad de tiempo); se expresa también en unidades de masa (comúnmente denominado biomasa) por unidad de tiempo. Esta se ve afectada por diversos factores que serán detallados líneas abajo y, además, por características genéticas de los microorganismos (Dos Santos, 2007).

Para calcular este parámetro existen modelos empíricos, es decir, basados en la experiencia y los resultados que los investigadores han reportado a lo largo de los años. A continuación, se citará los modelos más empleados y se abordará brevemente su desarrollo matemático.

i. *Modelo logístico*: Planteada por Quetelet y Verhulst; considera que la tasa de crecimiento depende de dos parámetros, estos son el factor de nacimiento y mortalidad de células. Asimismo, estos factores son dependientes del tamaño poblacional en el tiempo; esto es descrito como una ecuación lineal (Trinidad, 2014). El desarrollo matemático de este modelo efectuado por Trinidad (2014) puede ser encontrado en el anexo L.

Esta ecuación ya parametrizada (Zwietering et al., 1990) queda de la siguiente manera:

$$X = \frac{A}{1 + \exp\left(\frac{4\mu_{\max}}{A}(\lambda - t) + 2\right)} \quad (1.2)$$

ii. *Modelo de Gompertz*: Considera los mismos parámetros que el modelo logístico, tales como la tasa de crecimiento (factor de nacimiento y mortalidad celular) y la saturación de sistema (A_s), es decir, la capacidad máxima de crecimiento; la principal diferencia es que la tasa de crecimiento se ve afectada por una relación logarítmica entre la saturación del sistema y el crecimiento poblacional en el tiempo. La resolución matemática de Trinidad (2014) puede ser encontrada en el anexo M.

Del mismo modo que con el modelo logístico, esta ecuación también ha sido parametrizada. Zwietering et al. (1990) indican que, luego de las modificaciones, la ecuación de Gompertz queda de la siguiente manera:

$$X = A \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{\max}}{A}e(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (1.3)$$

iii. *Modelo de Baranyi*: Finalmente, el modelo de Baranyi es el más reciente de los mencionados en este trabajo. Se introduce conceptos nuevos, tales como que el tiempo de retardo es inversamente proporcional a μ_{\max} o el estado

fisiológico de la célula ($q(t)$), la cual expresa la potencial velocidad de crecimiento específica (Baranyi y Roberts, 1994); conceptos que, gracias a transformaciones matemáticas, adquieren gran connotación estadística. El detalle matemático del desarrollo empírico de este modelo no será abordado en el presente trabajo, no debido a su complejidad, sino porque no será empleado como parangón con los datos experimentales. De modo netamente teórico, se describe a continuación el modelo obtenido luego de la reevaluación de los parámetros hecha por Baranyi (1997) y Grijspeerdt y Vanrolleghem (1999):

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(e^{-\nu t} + e^{-h_0} - e^{-\nu t - h_0} \right) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{\frac{m\mu_{\max} t + 1}{\mu_{\max}} \ln \left(e^{-\nu t} + e^{-h_0} - e^{-\nu t - h_0} \right)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right) \quad (1.4)$$

Donde:

$x(t)$ es la concentración de células (en biomasa o en ufc/ml)

$y(t) = \ln(x(t))$ representa el logaritmo natural de la concentración de células

$y_0 = \ln(x_0)$ en donde x_0 es la concentración inicial de células

$y_{\max} = \ln(x_{\max})$ en donde x_{\max} representa la concentración de saturación del sistema

μ_{\max} es la velocidad máxima de crecimiento específica (h^{-1})

m es el parámetro de curvatura que caracteriza la transición desde la fase exponencial

ν es el parámetro de curvatura que caracteriza la transición a la fase exponencial

h_0 es el parámetro adimensional que cuantifica el estado fisiológico inicial de la célula

Cabe mencionar que el tiempo de latencia puede ser calculado de la siguiente manera:

$$\lambda(h) = h_0 / \mu_{\max} \quad (1.5)$$

Para uso práctico, se empleará su expresión matemática descrita por Cayré, Vignolo y Garro (2007):

$$y(t) = y_{\max} + \ln \left[\frac{-1 + \exp(\mu_{\max} \lambda) + \exp(\mu_{\max} t)}{-1 + \exp(\mu_{\max} t) + \exp(\mu_{\max} \lambda + y_{\max} - y_0)} \right] \quad (1.6)$$

Donde:

$y(t) = \ln x(t)$, siendo $x(t)$ la concentración de biomasa en el tiempo

$y_0 = \ln x_0$, siendo x_0 la concentración inicial de biomasa

$y_{\max} = \ln x_{\max}$, siendo x_{\max} la capacidad máxima del sistema

μ_{\max} es la velocidad máxima de crecimiento específica

λ es el tiempo de latencia

1.2.1.4. Factores influyentes

- i. *Temperatura*: Es un factor decisivo y se utiliza esencialmente para simular de manera reproducible y controlada el experimento. Los microorganismos pueden ser clasificados según su temperatura óptima de crecimiento. Madigan et al. (2009) presentan la siguiente imagen comparativa:

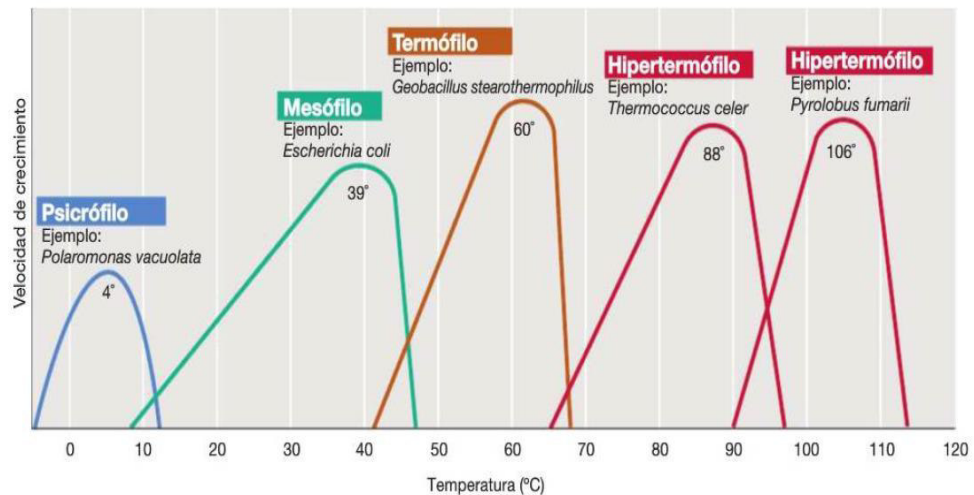


Figura 3. Relación entre la temperatura y las velocidades de crecimiento de microorganismos diferentes.

Fuente: Madigan et al. (2009)

Contribuye a modificar la cinética de todo el sistema de reacciones bioquímicas involucradas y, ergo, variar la tasa de crecimiento y la fase de latencia (Lobry, 1991). Para ejemplificar esto se puede decir que un incremento de la temperatura del sistema trae consigo un incremento en el valor de la constante de saturación de Monod y en la velocidad máxima de crecimiento específica (μ_{\max}). La primera puede ser expresada

matemáticamente mediante la ecuación de Arrhenius³; no obstante, según McMeekin, Olley, Ratkowsky, Corkrey y Ross (2013), los modelos tipo Arrhenius son de origen netamente químico, y no son adecuados para una cinética de reacciones biológicas.

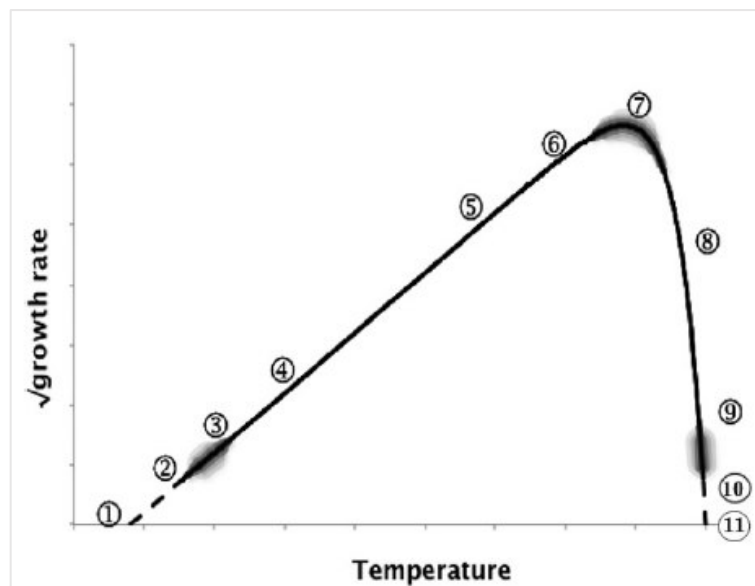


Figura 4. Curva típica de la raíz cuadrada de la constante de crecimiento específico vs. la temperatura⁴.
McMeekin et al. (2013)

- ii. *Actividad del agua (a_w):* El crecimiento de microorganismos es influenciado por este factor, ya que es el encargado de otorgar el balance entre electrolitos y no-electrolitos; obviamente, una variación de estos causaría una alteración notoria en este factor (Fysun, et al., 2015).
- iii. *Oxígeno disuelto (OD):* Fundamental para cultivos aerobios. La solubilidad de oxígeno en medios de cultivo es muy baja, por lo que su control durante el proceso es crucial para obtener los resultados esperados (Najafpour, 2015).

³ La ecuación de Arrhenius relaciona de manera empírica la constante de velocidad (en este caso, la constante de saturación del sistema) con la temperatura mediante la ecuación (Levine, 2004):

$$K_s = K_0 e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

Donde:

K_s es la constante de saturación del sistema, K_0 es el factor pre-exponencial y E_a es la energía de activación.

⁴ Los puntos en la curva son detallados como sigue: 1. T_{min} - temperatura mínima de crecimiento teórica; 2. MIN_t - temperatura mínima de crecimiento actual; 2-3. Región de variabilidad en la velocidad de crecimiento estimada debido a la distribución de los largos tiempos de respuesta; 4-5. Región de estabilidad máxima que rodea la temperatura óptima metabólica T_{mes} , punto máximo de estabilidad de la enzima; 6. Punto en el cual el índice de incremento de la velocidad de crecimiento específico comienza a declinar; 7. Punto en el cual se alcanza la máxima velocidad de crecimiento específica. La velocidad de crecimiento estimada es variable alrededor de esta temperatura; 8. Comienza el declive de la velocidad de crecimiento; 9-10. Región en la cual el declive es interrumpido y ocurre la inactivación; 10. MAX_t - temperatura máxima de crecimiento actual; 11. T_{max} - temperatura teórica máxima permitida para el crecimiento.

- iv. *pH*: Es un factor a tener en cuenta desde el inicio de la siembra. Anteriormente se ha mencionado que hay varios tipos de microorganismos; todos ellos tienen características diferentes, por lo que se les clasifica taxonómicamente. Ergo, cada uno de ellos crecerá en condiciones diferentes. Por ejemplo, Carrillo, Zavala y Alvarado (2007) resaltan que el crecimiento de *Rhizopus oryzae* es favorecido en condiciones de pH de 5 (ácido), y que esto, aunado a una temperatura de 20 °C y a una a_w de 0.895 conlleva al deterioro de los alimentos.
- v. *Nutrientes y factores limitantes*: Monod (1949) indica que los organismos quimiorganotrofos⁵ utilizan sustratos orgánicos (como fuente de energía), aceptor de hidrógenos, iones inorgánicos y CO₂ como componentes del medio (de cultivo); estas sustancias, en adición a sustancias orgánicas específicas (biotina, vitamina B12, etc.), que son conocidas como factores de crecimiento, son nutrientes esenciales por separado, sin embargo, juntos son considerados como un solo factor limitante en el crecimiento microbiano. Asimismo, se encontró una relación matemática entre el crecimiento total y la concentración del nutriente limitante; esta se puede considerar, generalmente, como lineal conforme la siguiente ecuación:

$$G=KC \quad (1.7)$$

Donde:

G: crecimiento total

C: concentración inicial de nutriente limitante

K: rendimiento de crecimiento

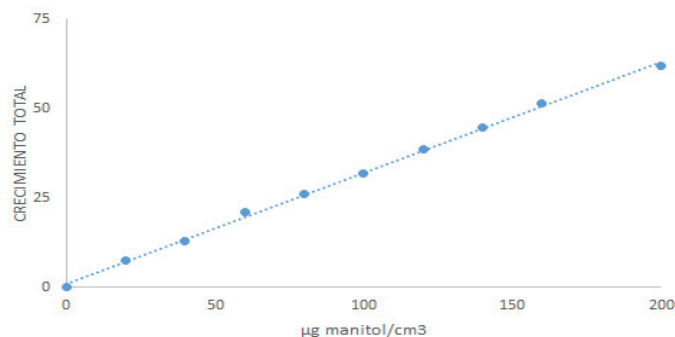


Figura 5. Crecimiento total de E. Coli en un medio sintético con sustrato orgánico (manitol) como factor limitante.

Fuente: Adaptación de Monod (1949)

⁵ Organismos que utilizan fuentes orgánicas y reacciones de reducción-oxidación para obtener energía.

- vi. *Sustrato*: Uno de los más importantes (o quizá el más importante) factor influyente en el crecimiento del microorganismo. La gran variabilidad de sustratos abre una amplia gama de opciones al momento de realizar el inóculo. Desde una fuente tan básica como la glucosa, hasta intrincadas redes poliméricas como el almidón, son utilizadas por estos micro entes. Para ejemplificar lo mencionado, Gonzáles, Meza, Gonzáles y Córdova (2013) han elaborado un cuadro (ver anexo A) en el que se compara la biomasa generada y la producción y tiempo de producción de PHA en diversas cepas microbianas utilizando diversas fuentes de sustrato.
- vii. *Relación C/N*: Se puede considerar la limitación de N como una condición de estrés para el microorganismo; esto podría afectar las rutas metabólicas de estos entes y facilitar la producción de metabolitos secundarios como el PHA (Becerra, 2013). Kato, Bao, Kang, Fukui y Doi (1996) clasifican estas relaciones en tres tipos:

Tabla 1. Relaciones C/N.

Relación molar C/N	Nivel
10	Balanceado
20	Desbalanceado
30	Desbalanceado alto

Fuente: Adaptación de Becerra (2013)

1.2.2. Modelos predictivos

Según Tienungoon, Ratkowsky, McMeekin y Ross (2000) estos modelos pueden ser catalogados como cinéticos o probabilísticos; los primeros son utilizados para determinar el tiempo en el que la cantidad de microorganismos en los alimentos es menor que un límite establecido, los segundos determinan si los microorganismos tienen la capacidad de crecer o no en determinadas condiciones. Naturalmente, el modelo cinético puede ser transformado en probabilístico mediante artificios matemáticos (por ejemplo, aplicando la función logaritmo natural). Otro modo de clasificación sería el planteado por Almudena (1999); según este criterio podrían ser divididos en:

1.2.2.1. *No estructurado-no segregado*

Considera el crecimiento celular como crecimiento de biomasa, formación de productos, respiración endógena⁶ y consumo de sustrato limitante. Da buenos resultados cuando la composición de microorganismos se aproxima al estado estacionario.

1.2.2.2. *Metabólicos*

Considera el todo como el metabolismo de compuestos orgánicos, sin diferenciar la biomasa; puede ser considerado, por lo tanto, como *no estructurado-no segregado*. Almudena (1999) esquematiza, de manera general, estos modelos como la figura 14, en la cual el sustrato (S) es usado o bien para formar nuevas células, o para formar productos (como etanol y CO₂) pasando, previamente, por un estado intermediario reducido (IR), el cual puede ser utilizado por la mitocondria para obtener energía en forma de ATP.

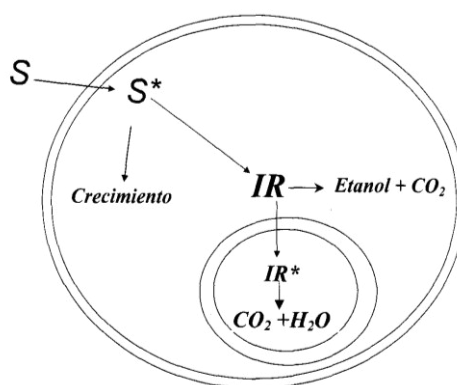


Figura 6. Esquema general de modelos metabólicos para *Saccharomyces cerevisiae*.
Fuente: Almudena (1999)

1.2.2.3. *Modelos estructurados o de célula*

Plantea la composición de la biomasa de forma estructurada. Puede ser subdividida en modelos compartimentados, que dividen a la célula en compartimentos con función específica, pero sin representación específica; y modelos de célula, que proponen reacciones de las que los compuestos intracelulares son partícipes. Las figuras 15 y 16 muestran modelos compartimentados de dos y tres celdas. La figura 17 muestra un modelo de célula.

⁶ Concepto que plantea que una parte de la biomasa es empleada en mantener al resto de células en estado viable. Este proceso adquiere velocidad constante y es independiente de la velocidad de crecimiento específica. A posteriori, conlleva a la disminución de la cantidad de biomasa una vez consumido el sustrato limitante (Málek y Beran, 1962).

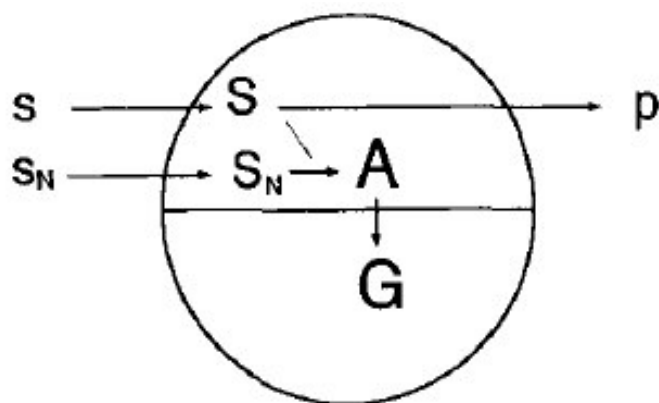


Figura 7. Representación de un modelo bi-compartmentado para fermentación de ácido láctico.
Fuente: Nielsen, Nikolajse y Villadsen (1990)

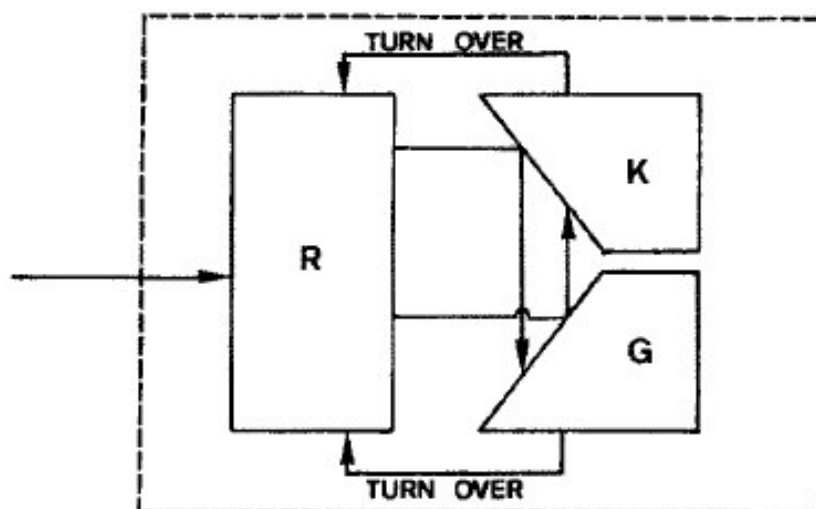


Figura 8. Representación de un modelo tri-compartmentado en el cual suceden reacciones químicas de formación de biomasa (R), síntesis de proteínas (G) y transcripción del RNA (K).
Fuente: Harder y Röels (1982)

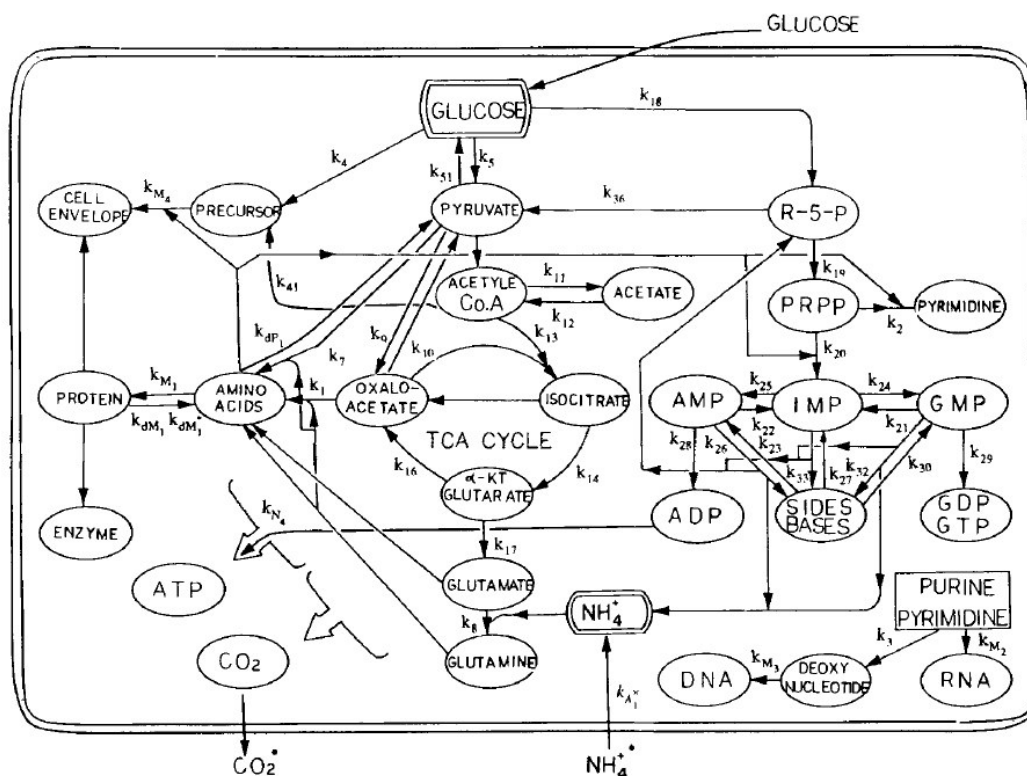


Figura 9. Modelo de célula para el crecimiento de *Bacillus subtilis* empleando glucosa como sustrato.
Fuente: Jeong, Snay y Ataai (1989)

1.2.2.4. Químicamente estructurados

Según este modelo, la biomasa es un compuesto macromolecular, en el cual suceden una serie de reacciones metabólicas. La diferencia de este modelo con el anterior radica en que los *químicamente estructurados* simplifican las reacciones metabólicas en pocos pasos.

1.2.2.5. Segregados

Son netamente estadísticos y describen el crecimiento como una función de distribución poblacional. Toman en cuenta, por ejemplo, la biomasa para efectuar los cálculos de distribución.

1.2.2.6. Modelos fenomenológicos

En el presente trabajo se plantea una clasificación diferente, pero con base en lo descrito por Almudena (1999).

El nombre de este nuevo tipo de clasificación proviene de los conocidos fenómenos de transporte, estos son los relacionados con la dinámica de fluidos,

transmisión de calor y transferencia de masa; se ha optado por este título, debido a que el crecimiento microbiano se ve afectado estos tres. Veámoslo desde este punto de vista, la velocidad de oxigenación puede afectar procesos catabólicos en microorganismos como *Escherichia coli* y producir sub-productos mediante secreciones (Varma, Boesch y Palsson, 1993); también existe transmisión de energía convectiva hacia la célula desde el medio de cultivo; y finalmente, para el caso de cultivos continuos (quimioestato⁷) es fundamental controlar la dinámica de los fluidos (medio de cultivo) al reactor para llevar el proceso en óptimas condiciones.

Habiendo ya tratado la clasificación hecha por Almudena (1999), podemos decir que estos modelos pertenecen al grupo de los *metabólicos*, ya que consideran que la biomasa es un compuesto que se ve involucrado en una serie de reacciones bioquímicas y que estas, a su vez, forman estados intermediarios *pseudomoleculares*⁸ que sirven como precursor al producto y a la biomasa final.

En el presente trabajo, se intentará explicar, mediante la cinética química, que dichos modelos fenomenológicos obedecen las reglas no solo del metabolismo de los microorganismos (primario y/o secundario), sino de una serie de transporte de materia de un medio a otro, involucrando la dinámica de los fluidos y la transferencia de energía.

⁷ Reactor para cultivo continuo, en el cual al reactor de volumen constante (V) se le inyecta el medio, que contiene sustancias esenciales para el crecimiento microbiano en exceso, a una velocidad constante. La particularidad radica en que el sustrato limitante es el único nutriente que permite controlar la biomasa (Tempest, 1970).

⁸ El término empleado refiere que los mecanismos involucrados en las reacciones forman compuestos que engloban a otros; por ende, no se puede decir que el producto es una única sustancia.

CAPÍTULO II.
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CEPA UTILIZADA

Pseudomonas putida ATCC® 31483 (adquirida a la empresa GenLab del Perú S.A.C.).



Figura 10. Ampolla de *Pseudomonas putida* liofilizada.

2.2. MATERIALES

- ✓ Balanza analítica
- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Matraces de 250 ml
- ✓ Pipetas de 2, 5 y 10 ml
- ✓ Estufa
- ✓ Papel pH indicador
- ✓ Espectrofotómetro GENESYS 20
- ✓ Cubetas para espectrofotómetro
- ✓ Centrífuga
- ✓ Asa de Kohle
- ✓ Embudo
- ✓ Papel filtro
- ✓ Vaso de precipitados
- ✓ Bagueta

2.3. METODOLOGÍA

Antes de iniciar un experimento, el investigador comienza por plantear y resolver ciertas interrogantes relativas al problema al cual se enfrenta, estas comienzan por una general y, posteriormente, se ramifican en varias específicas. Una vez absueltas estas interrogantes, se plantea el objetivo; este objetivo tiende a ser el ansiado punto de

llegada del experimento. Para cumplir el objetivo se tiene que elucidar alguna manera para arribar a él; ergo, partimos de una (o varias) suposición que sirve como base para argumento para iniciar con el desarrollo del experimento. Finalmente, para el análisis de los resultados se estudia dos tipos de variables: unas son controladas durante el experimento (variables independientes) y las otras son influenciadas por las anteriores (variables dependientes). Todas las anteriormente mencionadas están detalladas en una matriz, esta se encuentra en el anexo B de este trabajo.

A continuación, se procede con el diseño experimental y el procedimiento a ser ejecutado a partir de lo expresado en el párrafo anterior.

❖ Diseño del experimento

- Variable respuesta: Concentración de biomasa
- Factor: Glicerol
Nitrógeno (sulfato de amonio)
- Perturbaciones: Temperatura
pH

2.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.4.1. Reactivación del microorganismo

El pre-inóculo se hizo en medio nutritivo, cuya composición fue la siguiente:

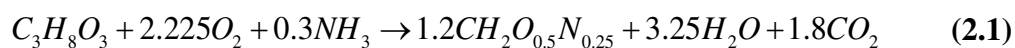
Tabla 2. Composición del medio de cultivo.

Compuesto	Concentración (g/L)
Peptona	5.00
MgSO ₄	1.39
K ₂ HPO ₄	1.00
C ₃ H ₈ O ₃	5.44
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.06

El inóculo se hizo en un medio similar al empleado por Becerra (2013) para la producción de PHA. Se dispuso de los compuestos en un matraz de 250 ml, midiéndolos previamente, y se procedió a la dilución utilizando 180 ml de agua desionizada. Luego, se esterilizó el medio empleando el método de calor húmedo durante 30 minutos y al retirarlo se cubrió con papel aluminio. Inmediatamente después, para la inoculación se empleó una ampolla de *Pseudomonas putida* ATCC 31483 liofilizado a temperatura de 23°C y a un pH entre 6.8 - 7. Pasados 5 días y para conservar el microorganismo, se sembró este en agar nutritivo; el asa

de Kohle fue esterilizada al flameado, después se introdujo en el matraz inoculado y se aplicó mediante estriado en el agar (previamente esterilizado).

La concentración de sustrato limitante es diferente en cada una de las muestras empleadas como cultivo batch; el objetivo es conocer el comportamiento del microorganismo con este sustrato en un medio estandarizado para la producción de biopolímero, según lo reportado por Gonzáles et al (2013). Asimismo, para cálculos generales, se considerará la fórmula general de bacterias propuesta por Duarte (1995) y el rendimiento de biomasa en función al glicerol ($Y_{x/s}$) de 40% (Becerra, 2013); esto nos servirá para definir la cantidad estequiométrica necesaria de NH_4^+ y $C_3H_8O_3$ para el crecimiento mediante la siguiente reacción.



De la cual podemos deducir que se requiere 1 mol de C proveniente del glicerol por cada 0.1 mol de amoníaco (proveniente del nitrato de amonio). Considerando esto se preparó el medio de cultivo con las siguientes especificaciones:

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo.

Compuesto	Concentración (g/L)		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
MgSO ₄	1.40	1.40	1.40
K ₂ HPO ₄	1.00	1.00	1.00
Glicerol	9.67	20.33	30.22
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.00	1.00	10.00
Relación C/N			
C/N	1.79	3.76	5.58

2.4.2. Preparación de las muestras

Se procedió a esterilizar las pipetas de vidrio en una estufa a 180°C durante 45 minutos. Como las concentraciones de sulfato de magnesio, hidrógeno fosfato de potasio y sulfato de amonio son las mismas para las 3 muestras, se preparó la solución a la concentración respectiva en un matraz 270 ml, luego se separó en 3 muestras de 90 ml y se agregó el glicerol en las cantidades necesarias para diferenciar las muestras para el experimento (10, 20 y 30 g/l). Una vez lista las soluciones, fueron esterilizadas con vapor húmedo durante 30 min para luego ser

inoculadas con la solución madre (1 ml en cada uno de los matraces). La temperatura de trabajo y de crecimiento fue de 23°C a un pH entre 6.8 – 7.



Figura 11. Solución madre, pre-inóculo de *Pseudomonas putida*.

2.4.3. Determinación de crecimiento

Se procedió a tomar muestras cada cierto tiempo, considerando también la temperatura antes de cada toma -se registró una media de 21°C- al comienzo en intervalos de tiempo muy cercanos y, luego, cada 8 horas. El procedimiento fue similar al registrado por Becerra (2013); las muestras consistieron en alícuotas de 5 ml, las cuales se mantuvieron a la intemperie durante 12 horas para luego ser centrifugadas con f variable. Luego, fueron centrifugadas a 2500 RPM durante 10 minutos, enseguida el sobrenadante fue descartado. Posteriormente, se le adicionó 2.5 ml de agua destilada y se centrifugó a 2500 RPM durante 10 minutos más para, igualmente, descartar el sobrenadante y agregar 2.5 ml de etanol al 70% v/v y centrifugar en las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y se le agregó cloroformo y, luego, se centrifugó a 1500 RPM durante 5 minutos. El resultante fue vertido en papel aluminio, previamente pesado, e introducido al horno a 60°C hasta peso constante. Finalmente, se registró el peso de la muestra tratada y, por diferencia de peso, se obtuvo el peso de la biomasa.



Figura 12. Solución madre y muestras experimentales.

2.4.4. Determinación de concentración de glicerol remanente

Para esto se empleó la metodología descrita por Pons et al. (1980), en la cual detalla el método cuantitativo para la estimación de glicerol en muestras biológicas. Una vez se tiene el líquido remanente de la centrifugación de la biomasa, se extrae 0.2 ml y se le mezcla con 2 ml de la solución de antrona⁹ (en proporción 1/10) en baño de agua fría para la rápida disipación del calor. Luego, se procede a calentar los tubos en baño maría con agua a 100°C. Finalmente, se vuelve a enfriar los tubos en un baño de agua helada para, a la postre, proceder con la toma de lecturas en el espectrofotómetro UV-Visible utilizando agua destilada como blanco; las lecturas fueron tomadas a 510 nm.



Figura 13. Espectrofotómetro GENESYS 20.

⁹ Solución preparada al diluir antrona (sal) al 75 % en masa en ácido sulfúrico al 84% w/v (Pons et al., 1990).



Figura 14. *Cubetas con muestras antes de ser introducidas al espectrofotómetro.*



Figura 15. *Tubos de ensayo con muestras remanentes luego de las lecturas.*

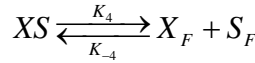
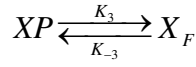
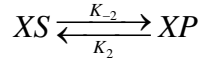
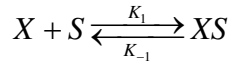
CAPÍTULO III.

**FORMULACIÓN DE MECANISMO Y
GENERACIÓN DEL MODELO CINÉTICO**

3.1. MECANISMO CINÉTICO PSEUDOMOLECULAR

Como indica el objetivo general del presente trabajo, se desarrollará un modelo que describa el crecimiento en biomasa de *Pseudomonas putida* utilizando glicerol como fuente de sustrato; para esto se supondrá el almacenamiento de biopolímero tipo PHA reportado por Fernández (2012) a pesar de no haberse comprobado su producción; esto se hace únicamente para facilitar el análisis matemático del modelo propuesto sin que este intente explicar la síntesis de dicho producto. Para esto se puede seguir dos caminos, considerar la concentración del sustrato dependiente del tiempo y mantenerla implícita en la cinética (Caso 1) o considerar la concentración del sustrato en función de la biomasa con biopolímero almacenado (Caso 2).

➤ Caso 1: Se considerará el mecanismo siguiente.



Ahora, se procederá a su resolución mediante el método del estado estacionario.

$$\begin{aligned} \frac{d[XS]}{dt} = & K_1[X][S] - K_{-1}[XS] + K_{-2}[XP] - K_2[XS] + \\ & K_{-4}[X_F][S_F] - K_4[XS] \end{aligned} \quad (3.1)$$

Aplicando el método del estado estacionario en (3.1):

$$0 = K_1[X][S] + K_{-4}[X_F][S_F] - (K_{-1} + K_2 + K_4)[XS] + K_{-2}[XP]$$

$$\frac{d[XP]}{dt} = K_2[XS] - K_{-2}[XP] + K_{-3}[X_F] - K_3[XP] = 0$$

$$0 = K_{-3}[X_F] + K_2[XS] - (K_{-2} + K_3)[XP]$$

$$0 = K_1[X][S] + K_{-4}[X_F][S_F] - (K_{-1} + K_4)[XS] - K_3[XP] + K_{-3}[X_F] \quad (3.2)$$

$$[XS] = K_1' [X][S] + K_{-4}' [X_F][S_F] + K_{-3}' [X_F] - K_3' [XP] \quad (3.3)$$

$$\frac{d[X_F]}{dt} = K_4 [XS] - K_{-4} [X_F][S_F] + K_3 [XP] - K_{-3} [X_F] \quad (3.4)$$

Despejando $[XP]$ de (3.2):

$$[XP] = \left(\frac{K_{-1} + K_4 + K_2}{K_{-2}} \right) [XS] - \frac{K_1}{K_{-2}} [X][S] - \frac{K_{-4}}{K_{-2}} [X_F][S_F]$$

$$[XP] = K^* [XS] - K_1'' [X][S] - K_{-4}'' [X_F][S_F] \quad (3.5)$$

$$[XP] = \left(\frac{K_{-3}}{K_{-2} + K_3} \right) [X_F] + \left(\frac{K_2}{K_{-2} + K_3} \right) [XS] \quad (3.6)$$

$$[XP] = K_{-3}'' [X_F] + K_2'' [XS] \quad (3.7)$$

Igualando (3.6) y (3.7):

$$K_{-3}'' [X_F] + K_2'' [XS] = K^* [XS] - K_1'' [X][S] - K_{-4}'' [X_F][S_F]$$

$$K_1'' [X][S] + [X_F] \{ K_{-3}'' + K_{-4}'' [S_F] \} = (K^* - K_2'') [XS]$$

$$K_1^* [X][S] + K^* [X_F] \{ K_{-3}'' + K_{-4}'' [S_F] \} = [XS] \quad (3.8)$$

Ahora, reordenando (3.3) tenemos:

$$[XP] = K_3''' [X_F] + K_2''' [XS] \quad (3.9)$$

Reemplazando (3.9) en (3.5):

$$\frac{d[X_F]}{dt} = K_4 [XS] - K_{-4} [X_F][S_F] - K_{-3} [X_F] + K_3^{IV} [X_F] + K_2^{IV} [XS]$$

$$\frac{d[X_F]}{dt} = (K_4 + K_2^{IV}) [XS] - K_{-4} [X_F][S_F] + (K_3^{IV} - K_{-3}) [X_F]$$

$$\frac{d[X_F]}{dt} = K_1^* [XS] - K_{-4} [X_F][S_F] + K_2^{**} [X_F] \quad (3.10)$$

Ahora reemplazamos (3.8) en (3.10):

$$\begin{aligned}\frac{d[X_F]}{dt} &= K_1^{**} \left(K_1^* [X][S] + K^* [X_F] \{ K_{-3}'' + K_{-4}'' [S_F] \} \right) - K_{-4} [X_F][S_F] + K_2^{**} [X_F] \\ \frac{d[X_F]}{dt} &= K_a [X][S] + [X_F] \{ K_b' + K_b'' [S_F] - K_{-4} [S_F] + K_2^{**} \} \\ \frac{d[X_F]}{dt} &= K_a [X][S] + [X_F] \{ K_b + K_c [S_F] \}\end{aligned}\quad (3.11)$$

Efectuamos la integración:

$$t = \frac{d[X_F]}{K_a [X][S] + [X_F] \{ K_b + K_c [S_F] \}} \quad (3.12)$$

Se ha encontrado una relación lineal entre $[S_F]$ y t :

$$[S_F] = a + bt \quad (3.13)$$

Reemplazando (3.13) en (3.12):

$$dt = \frac{d[X_F]}{K_a [X][S] + [X_F] \{ K_b + K_c (a + bt) \}} \quad (3.14)$$

Reordenando y sustituyendo las constantes:

$$\begin{aligned}dt &= \frac{d[X_F]}{\theta_1 + \theta_2 [X_F] + \theta_3 t [X_F]} \\ \frac{d[X_F]}{dt} &= \theta_1 + \theta_2 [X_F] + \theta_3 t [X_F]\end{aligned}\quad (3.15)$$

Resolviendo la EDO lineal homogénea asociada:

$$\frac{d[X_F]}{dt} = \theta_2 [X_F] + \theta_3 t [X_F] \quad (3.16)$$

$$\int \frac{d[X_F]}{[X_F]} = \int (\theta_2 + \theta_3 t) dt$$

$$\ln[X_F] = \theta_2 t + \frac{\theta_3}{2} t^2 + C \quad (3.17)$$

$$[X_F] = K \exp\left(\theta_2 t + \frac{\theta_3}{2} t^2\right) \quad (3.18)$$

$$[X_F] = K(t) \exp\left(\theta_2 t + \frac{\theta_3}{2} t^2\right) \quad (3.19)$$

$$\frac{d[X_F]}{dt} = \frac{dK(t)}{dt} \exp\left(\theta_2 t + \frac{\theta_3}{2} t^2\right) + K(t)(\theta_2 + \theta_3 t) \exp\left(\theta_2 t + \frac{\theta_3}{2} t^2\right) \quad (3.20)$$

$$\frac{dK(t)}{dt} e^{\left(\theta_2 t + \frac{\theta_3}{2} t^2\right)} + K(t)(\theta_2 + \theta_3 t) e^{\left(\theta_2 t + \frac{\theta_3}{2} t^2\right)} = \theta_1 + K(t)(\theta_2 + \theta_3 t) e^{\left(\theta_2 t + \frac{\theta_3}{2} t^2\right)}$$

$$\frac{dK(t)}{dt} = \theta_1 \exp\left(-\theta_2 t - \frac{\theta_3}{2} t^2\right) \quad (3.21)$$

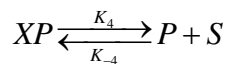
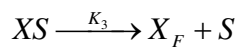
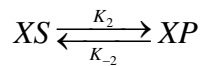
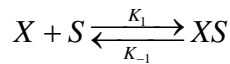
$$K(t) = \int \theta_1 \exp\left(-\theta_2 t - \frac{\theta_3}{2} t^2\right) dx$$

$$K(t) = \theta_1 \operatorname{erf}\left(\frac{\sqrt{\theta_3}}{\sqrt{2}} t + \frac{\sqrt{2}\theta_2}{2\sqrt{\theta_3}}\right) \exp\left(-\theta_2 t - \frac{\theta_3}{2} t^2\right) + \theta_4 \quad (3.22)$$

$$[X_F] = \left[\theta_1 \operatorname{erf}\left(\frac{\sqrt{\theta_3}}{\sqrt{2}} t + \frac{\sqrt{2}\theta_2}{2\sqrt{\theta_3}}\right) \exp\left(-\theta_2 t - \frac{\theta_3}{2} t^2\right) + \theta_4 \right] \exp\left(\theta_2 t + \frac{\theta_3}{2} t^2\right) \quad (3.23)$$

A pesar de la rigurosidad matemática aplicada durante la solución de este mecanismo, la desventaja de este mecanismo radica en su imposibilidad de ser procesado y, además, en su falta de significado biológico. Esto quiere decir que no siempre se puede obtener una descripción física realista de un proceso bioquímico a partir de un postulado netamente matemático.

➤ Caso 2: Se considerará el mecanismo siguiente.



Posteriormente, se procederá con su resolución por medio del método del estado estacionario de manera similar al caso anterior.

$$\frac{d[XS]}{dt} = K_1[X][S] - K_{-1}[XS] + K_{-2}[XP] - K_2[XS] - K_3[XS] \quad (3.24)$$

$$\frac{d[XP]}{dt} = K_2[XS] - K_{-2}[XP] - K_4[XP] + K_{-4}[P][S] \quad (3.25)$$

Igualando (3.24) a cero:

$$(K_4 + K_{-2})[XP] = K_2[XS] + K_{-4}[P][S]$$

$$[XP] = \frac{K_2}{K_4 + K_{-2}}[XS] + \frac{K_{-4}}{K_4 + K_{-2}}[P][S] \quad (3.26)$$

Reemplazando (3.26) en (3.25) e igualando a cero:

$$(K_{-1} + K_2 + K_3)[XS] = K_{-2}[XP] + K_1[X][S]$$

$$(K_{-1} + K_2 + K_3)[XS] = K_{-2} \left(\frac{K_2}{K_4 + K_{-2}}[XS] + \frac{K_{-4}}{K_4 + K_{-2}}[P][S] \right) + K_1[X][S]$$

$$\left(K_{-1} + K_2 + K_3 - \frac{K_2}{K_4 + K_{-2}} \right) [XS] = \frac{K_{-4}}{K_4 + K_{-2}} [P][S] + K_1[X][S]$$

Considerando que $[P]$ es prácticamente cero:

$$[P] \approx 0$$

Entonces la ecuación se convierte en:

$$K_5[XS] = K_1[X][S]$$

$$[XS] = \frac{K_1}{K_5}[X][S] = K_6[X][S] \quad (3.27)$$

Ahora se procede con $[X_F]$:

$$\frac{d[X_F]}{dt} = K_5[XS] = K_1[X][S] \quad (3.28)$$

Pero
$$[X_F] = [X] + [P] \approx [X]$$

Además, considerando el rendimiento como:

$$Y_{X/S} = \frac{[X_0] - [X_F]}{[S_0] - [S]}$$

$$[S_0]Y_{X/S} - [S]Y_{X/S} = [X_0] - [X_F]$$

$$[S] = ([S_0]Y_{X/S} + [X_0]) + \frac{1}{Y_{X/S}}[X_F]$$

$$[S] = \alpha + \beta[X_F] \quad (3.29)$$

Reemplazando (3.29) en (3.27):

$$\frac{d[X_F]}{dt} = K_1[X_F](\alpha + \beta[X_F])$$

$$\frac{d[X_F]}{dt} = K_1\alpha[X_F] + K_1\beta[X_F]^2$$

Para resolver la ecuación hay que hacer un arreglo:

$$\frac{d[X_F]}{dt} = [X_F]^2 (K_\beta + K_\alpha[X_F]^{-1}) \quad (3.30)$$

Cambiando la variable:

$$[X_F]^{-1} = u$$

$$\frac{-1}{[X_F]^2} d[X_F] = du$$

Despejando la ecuación (3.30) y cambiando la variable:

$$\frac{-1}{[X_F]^2} d[X_F] = -(K_\beta + K_\alpha[X_F]^{-1})$$

$$\frac{du}{dt} = -K_\beta - K_\alpha u$$

$$\int \left(\frac{K_\alpha}{K_\alpha u + K_\beta} \right) du = -K_\alpha \int dt$$

$$\ln |K_\alpha u + K_\beta| = -K_\alpha t + C_1$$

$$K_\alpha u + K_\beta = \exp(-K_\alpha t + C_1)$$

$$K_\alpha u + K_\beta = A e^{-K_\alpha t}$$

$$\frac{K_\beta}{K_\alpha} + u = \frac{A}{K_\alpha} e^{-K_\alpha t}$$

Volviendo a cambiar la variable:

$$[X_F]^{-1} = \frac{A}{K_\alpha} e^{-K_\alpha t} - \frac{K_\beta}{K_\alpha}$$

$$[X_F] = \frac{K_\alpha}{A e^{-K_\alpha t} - K_\beta} \quad (3.31)$$

Renombrando los parámetros de la ecuación y reordenando:

$$X = \frac{\gamma}{1 + \psi e^{\eta t}} \quad (3.32)$$

Como se observa, la ecuación muestra tres parámetros sin ningún significado biológico aparente. Zwietering et al. (1990) detallan el proceso para la reparametrización de modelos de crecimiento.

Se obtiene primero el punto de inflexión empleando la segunda derivada:

$$\frac{dX}{dt} = -\gamma \psi \eta e^{\eta t} (1 + \psi e^{\eta t})^{-2} \quad (3.33)$$

$$\frac{d^2 X}{dt^2} = \gamma \psi \eta^2 e^{\eta t} (\psi e^{\eta t} - 1) (1 + \psi e^{\eta t})^{-3} \quad (3.34)$$

En el punto de inflexión, la segunda derivada es igual a cero:

$$\frac{d^2 X}{dt^2} = 0$$

$$\gamma\psi\eta^2 e^{\eta t} (\psi e^{\eta t} - 1) (1 + \psi e^{\eta t})^{-3} = 0$$

Como los parámetros no pueden valer cero, entonces:

$$(\psi e^{\eta t} - 1) = 0$$

$$\psi e^{\eta t} = 1$$

$$\frac{1}{\psi} = e^{\eta t}$$

$$\frac{1}{\eta} \ln \psi^{-1} = t \quad (3.35)$$

Reemplazando en la primera derivada:

$$\mu_{\max} = \frac{dX}{dt} = -\gamma\psi\eta e^{\eta \frac{1}{\eta} \ln \psi^{-1}} \left(1 + \psi e^{\eta \frac{1}{\eta} \ln \psi^{-1}} \right)^{-2}$$

$$\mu_{\max} = -\gamma\eta(1+1)^{-2}$$

$$\mu_{\max} = \frac{-\gamma\eta}{4} \quad (3.36)$$

Asimismo, Zwietering et al. (1990) plantean que:

$$\mu_{\max} = \frac{X_F - X_0}{t - t_0} = \frac{X - \frac{\gamma}{2}}{t - \frac{1}{\eta} \ln \psi^{-1}} \quad (3.37)$$

Pero, analizando X_0 en el punto de inflexión:

$$X_0 = \frac{\gamma}{1 + \psi e^{\eta \frac{1}{\eta} \ln \psi^{-1}}} = \frac{\gamma}{2}$$

Aplicando la ecuación (3.37) en el punto de inflexión:

$$\mu_{\max} \lambda + \frac{\gamma}{2} - \mu_{\max} \frac{1}{\eta} \ln \psi^{-1} = 0$$

Considerando λ como tiempo de latencia:

$$\mu_{\max} \left(\frac{1}{\eta} n \psi^{-1} - \lambda \right) = \frac{\gamma}{2}$$

$$\frac{1}{\eta} n \psi^{-1} = \frac{\gamma}{2\mu_{\max}} + \lambda$$

$$\eta = \frac{\ln \psi^{-1}}{\frac{\gamma}{2\mu_{\max}} + \lambda}$$

$$\eta = \frac{2\mu_{\max} \ln \psi^{-1}}{\gamma + 2\mu_{\max} \lambda} \quad (3.38)$$

Despejando λ de (3.38):

$$\eta\gamma + 2\mu_{\max} \eta\lambda = 2\mu_{\max} \ln \psi^{-1}$$

$$\lambda = \frac{2\mu_{\max} \ln \psi^{-1} - \eta\gamma}{2\mu_{\max} \eta} \quad (3.39)$$

Se ha determinado analíticamente los parámetros biológicos, tales como el tiempo de latencia, velocidad máxima de crecimiento específica y el factor de capacidad del sistema; este último no se ha desarrollado líneas arriba, puesto que ya se encuentra en la ecuación obtenida como el numerador de la fracción.

3.2. CÁLCULOS CINÉTICOS

Una vez obtenidos los datos experimentales de biomasa y concentración de glicerol los primeros se procesarán utilizando el software MiniTab, el cual, además, proporciona información sobre las iteraciones empleadas para determinar los parámetros cinéticos postulados en las ecuaciones ya descritas (logística, Gompertz y Baranyi), pruebas estadísticas de error, residuos, etc.; los segundos serán ajustados a una línea recta siguiendo la Ley de Lambert y Beer, para hallar su concentración en el tiempo.

Todos los datos serán procesados considerando un intervalo de confianza del 95%. Los parámetros cinéticos de las ecuaciones fueron obtenidos de modo analítico, empleando los parámetros iniciales resultantes del programa MiniTab.

Desde el punto de vista estadístico, se compararán los parámetros de crecimiento (tiempo de latencia, velocidad máxima de crecimiento específica, capacidad del sistema y tiempo de generación). Asimismo, una vez obtenidas las ecuaciones respectivas, se recrearán 3 escenarios para cada una de las 3 muestras, los cuales son los siguientes:

Tabla 4. Escenarios de ensayo

N° Escenario	Concentración inicial de sustrato (g/l)
1	10
2	20
3	30

Una vez procesados los datos experimentales con las 3 curvas de crecimiento sugeridas por otros autores -válgame mencionar nuevamente los modelos de Gompertz, logístico, Baranyi- y con el nuevo modelo obtenido, se procederá a la comparación de este último con el otro que posea la curvatura más semejante, en caso sea conveniente. Para esto se aplicará la serie de Taylor en un punto en el cual ambas funciones sean diferenciables (punto a) siguiendo lo descrito por Edwards y Penney (2009):

$$\sum_{n=0}^{\infty} \frac{f^{(n)}(a)}{n!} (x-a)^n = f(a) + f'(a)(x-a) + \frac{f''(a)}{2!} (x-a)^2 + \dots \quad (3.40)$$

Si en el punto diferenciable “a” para la serie de Taylor de orden 5, el resultado es bastante similar (o el mismo) se podrá inferir que ambas ecuaciones serían las mismas en el límite.

CAPÍTULO IV.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. PARÁMETROS CINÉTICOS

El presente trabajo constituye un experimento multifactorial (llámese: temperatura, pH, OD, a_w , etc.) en el medio de cultivo y, por ende, en el microorganismo, resulta muy complicado si no se analiza uno puntualmente.

Los parámetros y_{\max} y y_{\min} , adicionales a los convencionales, presentes en el modelo de Baranyi varían entre 2.1105 – 2.4269 y -0.3435 – 0.1687, respectivamente; su significado biológico expresa las concentraciones (en escala logarítmica) máximas y mínimas de biomasa presentes en el medio; esto concuerda con lo reportado por Vanegas y Ramírez (2016) para el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*, quienes presentan valores de entre 3.363 – 2.885 y 0.000 – 0.083 para y_{\max} y y_{\min} respectivamente. El parámetro μ_{\max} tiene tendencia creciente en todos los modelos, en concordancia con lo descrito por Ossa, Vanegas y Basillo (2010), siendo el modelo de Baranyi el que presenta valores menores por los motivos ya referidos en el párrafo anterior.

Por otro lado, el parámetro λ no muestra muchas diferencias para los 3 escenarios propuestos (concentraciones de sustrato diferentes), sin embargo, en los tres casos, el valor mayor se presenta en la mayor concentración de sustrato en el medio (20 g/l).

En las condiciones del experimento no se pudo determinar el rol que cumplirían factores tales como temperatura, pH o la a_w , puesto que estos se han mantenido constantes; mas sí el desempeñado por el sustrato. Según lo reportado por Shang, Jiang, Yun, Yan y Chang (2008), cultivos de *Pseudomonas putida* en cultivos batch alimentados que emplean ácido linoleico, aceite de palma y de maíz, entre otros; pueden llegar a producir biomasa con una velocidad de crecimiento específica de entre 0.012 – 1.9 h⁻¹, lo cual concuerda con lo obtenido experimentalmente utilizando glicerol como sustrato.

Al analizar el tiempo de generación, se observa que este es creciente en todas las ecuaciones, excepto en la de Gompertz, ya que para este caso el tiempo disminuyó al aumentar la concentración de sustrato de 20 a 30 g/l. Este modelo también presenta una particularidad en comparación a las otras, puesto que el tiempo de latencia es consistentemente ascendente para este caso, mientras que en los otros tres este parámetro fue ascendente durante la transición de 10 a 20 g/l, pero descendente al

pasar de 20 a 30 g/l, similar a lo reportado por Duffy, Vanderlinde y Grau (1994) al variar el pH.

Un hecho curioso suscitado al comparar los parámetros de crecimiento entre los 4 modelos fue notar que dichos parámetros son iguales para los modelos logístico y el de estudio; esto podría deberse a la similitud matemática existente entre ambos. Los dos adoptan una forma de cociente en cuyo denominador aparece una función exponencial del tiempo, el cual se ve afectado por uno de los parámetros cinéticos. Posteriormente, se establecerá una comparación matemática entre ambos utilizando la serie de Taylor, para comprobar si se trata de la misma ecuación comprendida entre los mismos puntos derivables.

En las tablas 5, 6, 7 y 8 se presenta los parámetros cinéticos resultantes de las 3 diferentes concentraciones de glicerol ajustados con las ecuaciones logística, de Gompertz, de Baranyi y la obtenida mediante la cinética planteada en el capítulo anterior (a la cual se ha llamado modelo de estudio). En este punto cabe aclarar que, si bien los modelos son matemáticamente diferentes y, por lo tanto, su connotación biológica también (véase punto 1.2.2.); no se puede establecer un parangón absoluto entre la velocidad máxima de crecimiento específica obtenida mediante el modelo de Baranyi y las demás, porque en la primera se utiliza los valores de logaritmos de la concentración de biomasa (expresada en g/l) y en las demás se emplea la concentración de biomasa como tal (g/l).

Tabla 5. Parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo logístico.

Concentración sustrato (g/l)	Modelo Logístico			
	A_s (g/l)	μ_{\max} (h ⁻¹)	λ (h)	t_g (h)
10	8.3037	0.9234	0.8338	3.5258
20	8.5054	1.2179	0.7621	3.6122
30	11.5360	1.3183	1.0728	3.6833

Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo de Gompertz.

Concentración sustrato (g/l)	Modelo de Gompertz			
	A_s (g/l)	μ_{\max} (h ⁻¹)	λ (h)	t_g (h)
10	8.3125	0.9588	0.7078	4.8639
20	8.5164	1.3389	0.8372	5.5715
30	11.5529	1.3631	0.9303	5.2501

Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo de Baranyi.

Concentración sustrato (g/l)	Modelo de Baranyi				
	μ_{\max} (h ⁻¹)	λ (h)	t_g (h)	y_{\max}	y_{\min}
10	0.4915	0.5104	3.5170	2.1105	-0.3435
20	0.6070	0.2128	3.5958	2.1293	-0.3797
30	0.5851	1.0145	3.7199	2.4269	-0.1687

Tabla 8. Parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo de estudio.

Concentración sustrato (g/l)	Modelo de estudio			
	A_s (g/l)	μ_{\max} (h ⁻¹)	λ (h)	t_g (h)
10	8.3037	0.9234	0.8338	3.5258
20	8.5054	1.2179	0.7621	3.6122
30	11.5359	1.3182	1.0728	3.6833

A continuación, se muestra una comparación gráfica entre dos de los parámetros más representativos obtenidos mediante cada una de las ecuaciones para tener una mejor idea de la variación entre estas debido a la formulación matemática de cada una. Cabe indicar que se ha escogido la velocidad máxima de crecimiento específica y el tiempo de latencia, ya que el primero refleja el comportamiento del microorganismo al momento de reproducirse, lo que indica una mejor adaptación al medio; y el otro representa el tiempo óptimo en el que dicha adaptación se lleva a cabo.

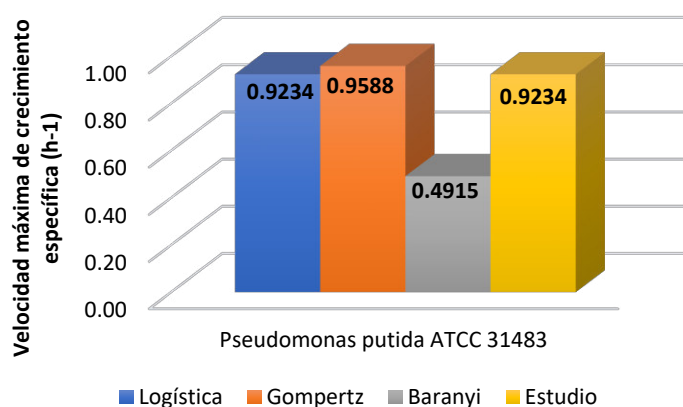


Figura 16. Velocidad máxima de crecimiento específica (10 g/l sustrato).

Fuente: Elaboración propia

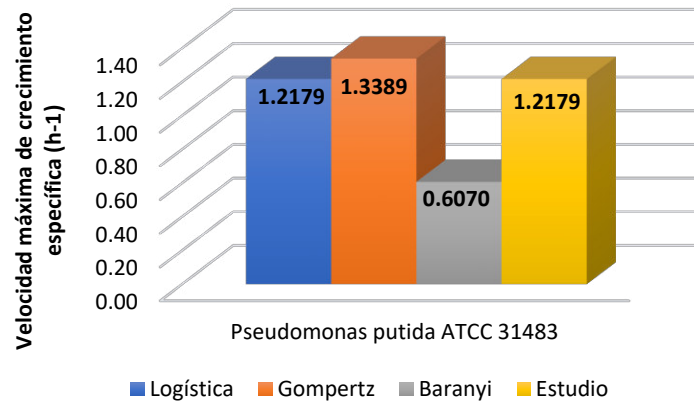


Figura 17. Velocidad máxima de crecimiento específica (20 g/l sustrato).
Fuente: Elaboración propia

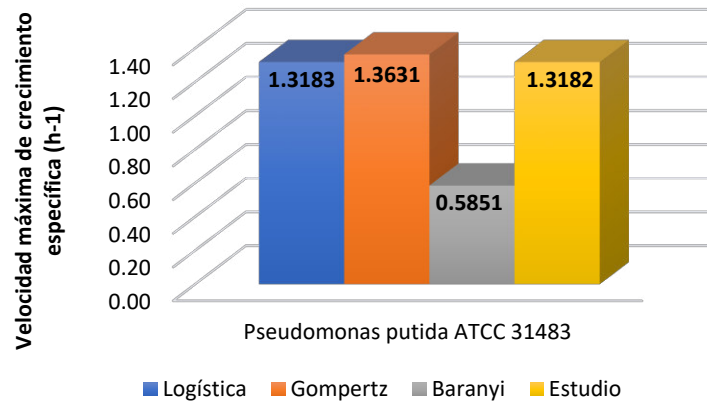


Figura 18. Velocidad máxima de crecimiento específica (30 g/l sustrato).
Fuente: Elaboración propia

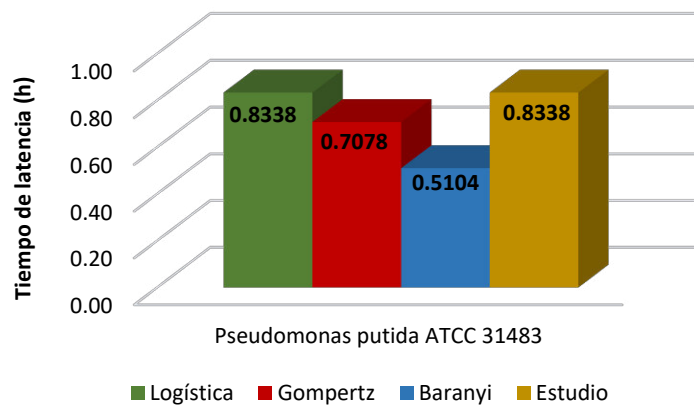


Figura 19. Tiempo de latencia (10 g/l sustrato).
Fuente: Elaboración propia

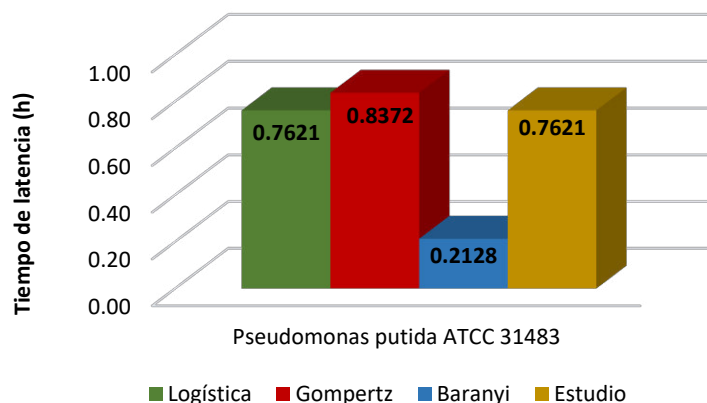


Figura 20. Tiempo de latencia (20 g/l sustrato).
Fuente: Elaboración propia

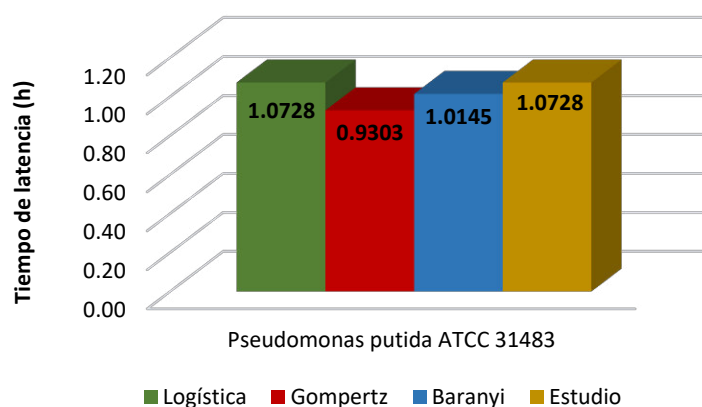


Figura 21. Tiempo de latencia (30 g/l sustrato).
Fuente: Elaboración propia

4.2. CONCENTRACIÓN DE GLICEROL

De acuerdo con lo descrito por Pons et al. (1990) en su metodología para determinar los carbohidratos totales en muestras biológicas, se determinó la cantidad de glicerol presente en las muestras mediante la intersección de las lecturas de absorbancia en la curva de calibración patrón resultante de las lecturas de absorbancia de soluciones acuosas de glicerol a 10, 20 y 30 g/l. Las lecturas se realizaron a 510 nm y no a 590 nm, puesto que según Pons et al. (1990) el glicerol no absorbe la luz a 590 nm; además, no se realizó lecturas a ambas longitudes de onda, puesto que, al no existir glucosa (no presente en el medio), no había necesidad de hallar estas concentraciones por separado.

La validación de la curva de calibración patrón (ver figura 30) muestra una buena linealidad, con un ajuste de $R^2=0.9802$, por lo que representa con fiabilidad el ajuste experimental.

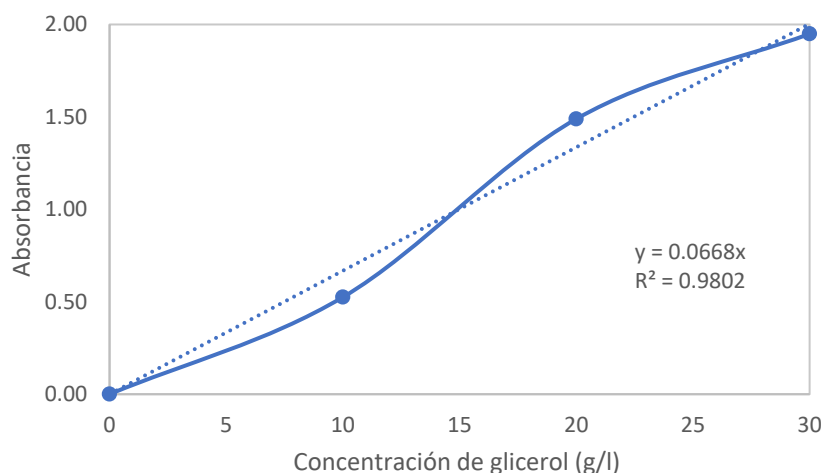


Figura 22. Curva de patrones de glicerol.
Fuente: Elaboración propia

Las siguientes figuras representan el avance del consumo del sustrato (glicerol) en el tiempo para los 3 escenarios propuestos, en el que el primero presenta una concentración de sustrato de 10 g/l, el segundo 20 g/l y el tercero 30 g/l (aparente). Se observa que el sustrato no ha sido consumido en su totalidad, a diferencia de lo que se esperaba. Para todos los escenarios, luego de transcurridas 70 h, las concentraciones finales de glicerol fueron de 4.42, 14.42 y 17.11 g/l para el primer, segundo y tercer escario, respectivamente; Además, el coeficiente de determinación R^2 fue en todos los casos superior al 90%, consistente con una correlación fuerte, según lo escrito por Devore (2008). Vanegas y Ramírez (2016) emplearon en su trabajo melaza y glucosa en concentraciones de 10 y 20 g/l respectivamente; por lo que una comparación con estos sustratos no sería conveniente, ya que en esos casos la conversión del sustrato se realizó al 100%.

Un aspecto que resalta en las curvas de ajuste para casos como este, es que la concentración inicial (extrapolada) es siempre mayor a la supuesta desde el comienzo del experimento; estas son de 13.279 g/l para el escenario 1, 24.018 g/l para el escenario 2 y 29.554 g/l para el último escenario. El valor obtenido mediante la extrapolación para los dos primeros escenarios es mayor que la concentración inicial aparente, mientras que para el último caso es muy similar. Es de suponer que estos errores se hayan suscitado al momento de preparar los inóculos respectivos al comienzo del experimento.

Además, un aspecto relevante para tener en cuenta es que el glicerol no se agotó en ninguno de los 3 escenarios. Esto se deba posiblemente al medio en el cual se desarrolló la reactivación del microorganismo, en este se empleó una concentración de 5 g/l de peptona y 5 g/l de glicerol (relación C/N = 1), en este medio el crecimiento inicial se vio favorecido gracias a la acción conjunta de la fuente de C y de N; sin embargo, para los casos siguientes en los cuales se tiene una relación C/N de 1.79, 3.76 y 5.58, al no existir una relación C/N igual a la inicial, el microorganismo optó por no consumir toda la fuente de carbono.

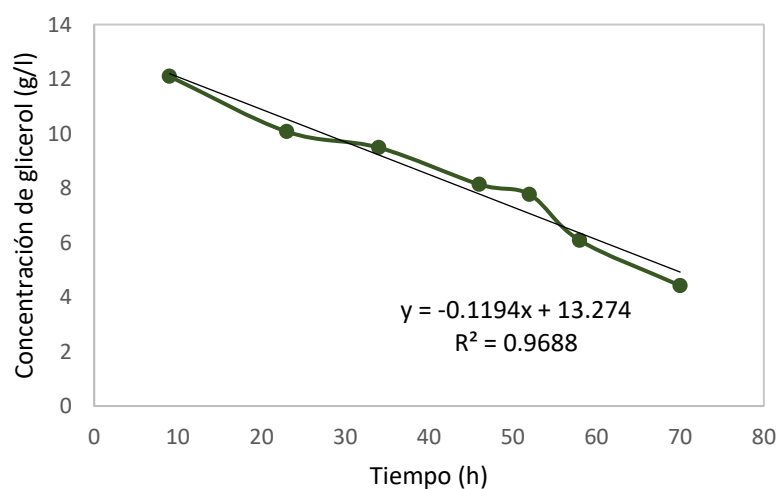


Figura 23. Curva de consumo de glicerol para el escenario 1.
Fuente: Elaboración propia

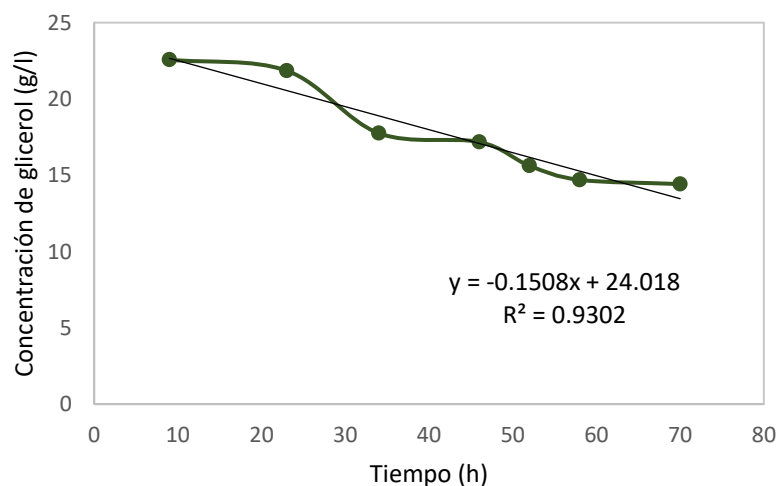


Figura 24. Curva de consumo de glicerol para el escenario 2.
Fuente: Elaboración propia

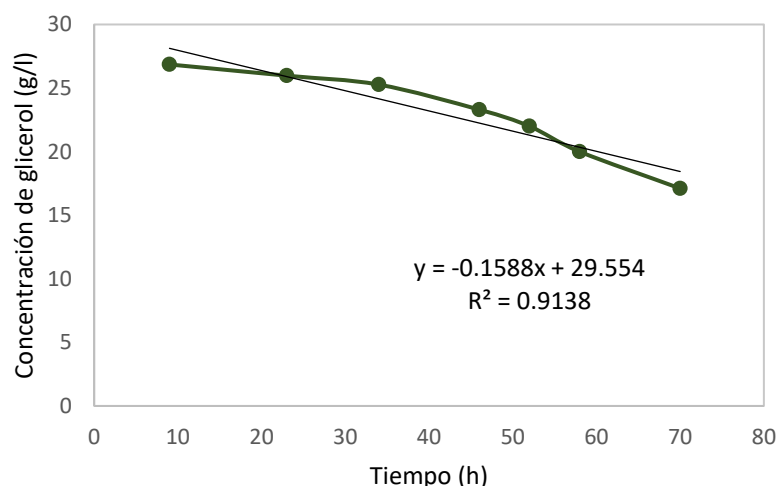


Figura 25. Curva de consumo de glicerol para el escenario 3.
Fuente: Elaboración propia

4.3. BIOMASA

Este es el punto más importante del experimento, pues con esto se puede comparar el modelado de la curva de crecimiento para cada uno de los casos respectivos. Como ya se mencionó, se emplearon 4 modelos para el ajuste de los datos experimentales; una vez modelados los datos experimentales se procede a comparar los parámetros de crecimiento, tales como μ_{\max} , λ y A_s , salvo en el caso del modelo de Baranyi, en el que el parámetro A es reemplazado por y_{\max} . De entre estos, el determinante en la gráfica es A , el cual va a limitar el crecimiento del microorganismo en el medio.

El software escogido para realizar el ajuste es MiniTab, el cual, por medio del algoritmo Levenberg-Marquardt, realiza iteraciones suponiendo los valores iniciales de los parámetros hasta encontrar el óptimo. Asimismo, las gráficas residuales para cada tipo de ajuste podrán ser encontradas en los anexos D, E, F y G. Para el cálculo de los parámetros, el valor estimado es contrastado con el EE de la estimación y su intervalo de confianza al 95%; además, se puede establecer una relación entre los parámetros mediante una matriz de correlación. Esta información puede ser encontrada en los anexos H, I, J y K. Otros datos como la SSE, la cual es siempre la mínima que el algoritmo pudo obtener; el MSE, que representa la varianza en torno a los datos; y S , que representa la desviación estándar de la distancia entre los valores de datos y los valores ajustados, puesto que el R^2 no tiene sentido fuera del contexto del modelo lineal, pueden ser encontrados también en los anexos H, I, J y K.

Se toma como medida principal de comparación en este caso el parámetro A_s , el cual representa la capacidad máxima de crecimiento del sistema. Para todos los escenarios propuestos, el modelo de Gompertz evidenció el mayor valor de este parámetro, siendo estos de 8.3125, 8.5054 y 11.5525 g/l para los tres escenarios respectivos.

Según Shang, Jiang, Yun, Yan y Chang (2008), cultivos de *Pseudomonas putida* pueden producir hasta 54.8 g/l empleando glucosa y octanoatos como sustrato, por lo que el crecimiento máximo reportado, al ser contrastado con la fuente en mención, es consistente, puesto que al ser un cultivo batch, el crecimiento debería ser más limitado dependiendo el tipo de cultivo (Doran, 2013).

Un hecho resaltante en las gráficas de crecimiento en biomasa del microorganismo, es el entrecruzamiento de las curvas resultantes de los modelos logístico y de estudio, llegando a solaparse entre sí durante todo el proceso. En las figuras 26, 27 y 28 se presenta el modelamiento matemático obtenido al ajustar los datos experimentales a las ecuaciones anteriormente descritas.

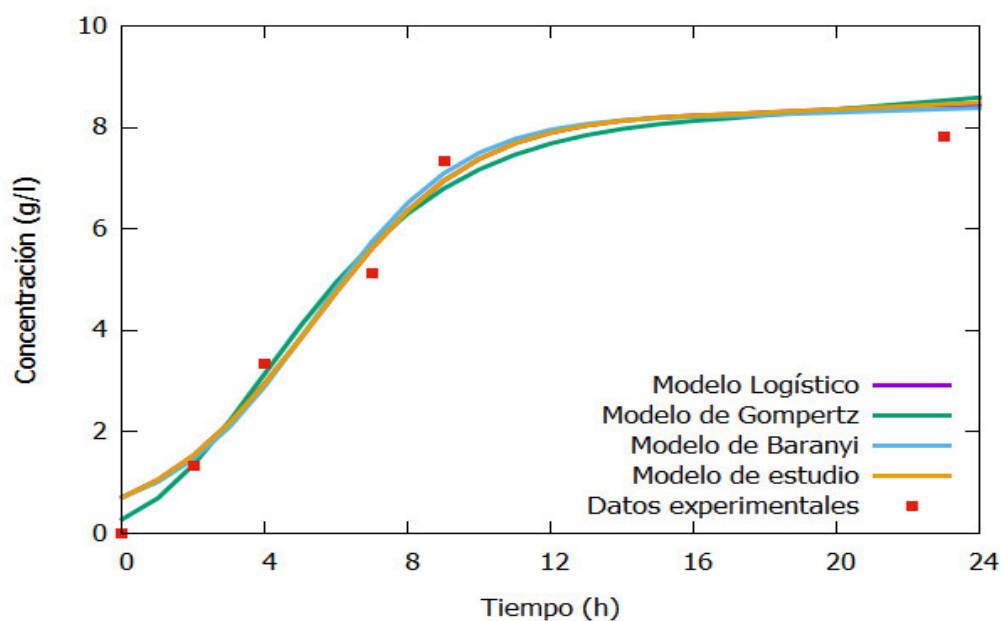


Figura 26. Curva de crecimiento de *Pseudomonas putida* (Concentración de sustrato inicial 10 g/l).
Fuente: Elaboración propia.

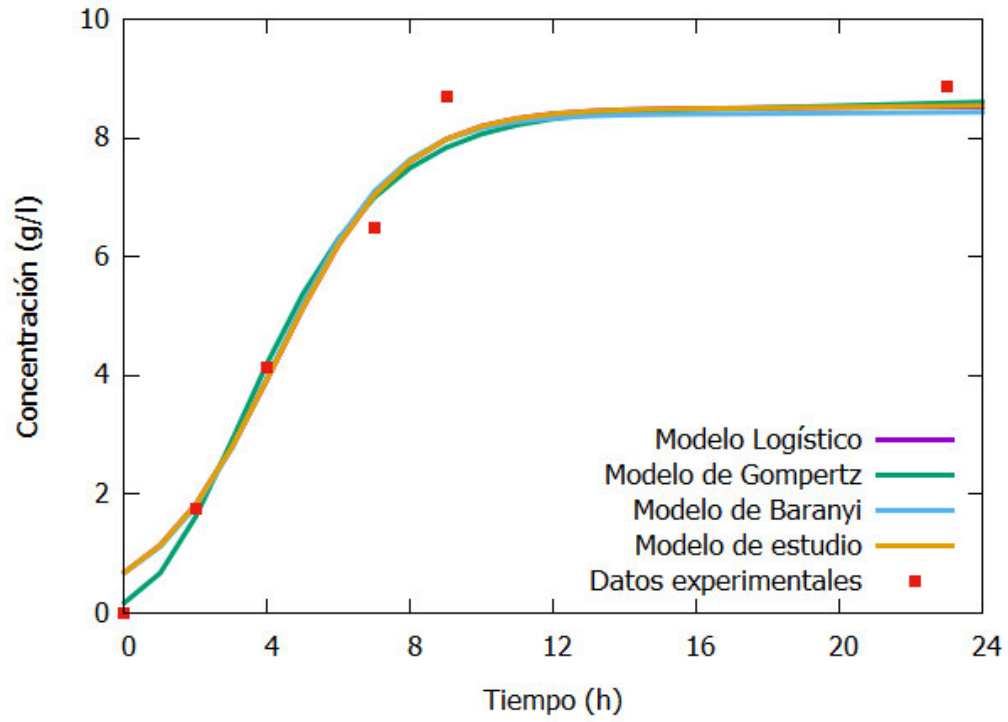


Figura 27. Curva de crecimiento de *Pseudomonas putida* (Concentración de sustrato inicial 20 g/l).
Fuente: Elaboración propia.

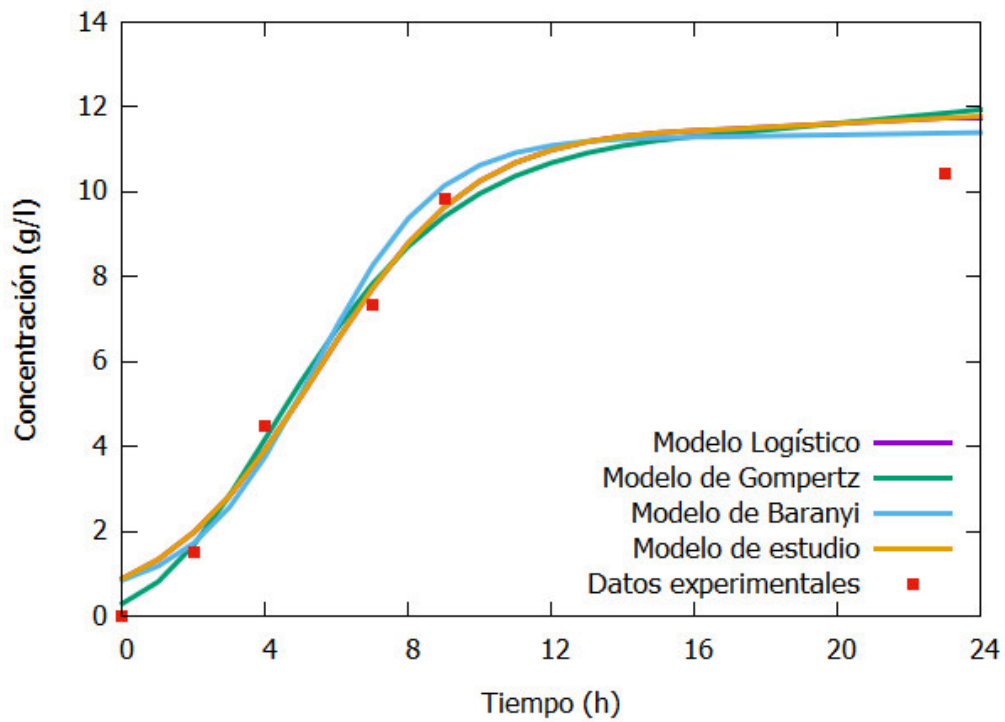


Figura 28. Curva de crecimiento de *Pseudomonas putida* (Concentración de sustrato inicial 30 g/l).
Fuente: Elaboración propia

Por otro lado, si el análisis parte por evidenciar las diferencias del crecimiento entre los diferentes medios (con concentración diferente de sustrato) las pendientes se van haciendo cada vez más pronunciadas conforme aumenta la concentración del sustrato limitante. Esto se debe posiblemente a la concentración del sustrato empleado; al existir cantidades de glicerol diferentes en los medios es lógico pensar que el resultado no sería el mismo para los tres escenarios. Al plantear un balance de materia en el sistema batch para la reacción propuesta por Duarte (1995) (véase punto 2.4.1.):

$$Acumulación = Generación - Consumo$$

Haciendo énfasis únicamente en la acumulación de biomasa en función de su generación a partir del glicerol, se tiene:

$$X_M = (r_x)C \quad (4.1)$$

En donde:

r_x representa la velocidad de reacción (la cual es igual a μ_{max} durante la etapa de crecimiento exponencial)

C representa la concentración de glicerol.

Se puede deducir a partir de la μ_{max} que mientras mayor sea su valor (pendiente más pronunciada) habrá mayor acumulación de biomasa, lo cual explicaría la cantidad máxima de biomasa para cada uno de los escenarios.

Además, en todos los casos se da un ligero traslape entre las curvas resultantes empleando 20 y 30 g/l de glicerol como sustrato. Esto se puede apreciar mejor en las figuras 29, 30, 31 y 32 presentadas a continuación.

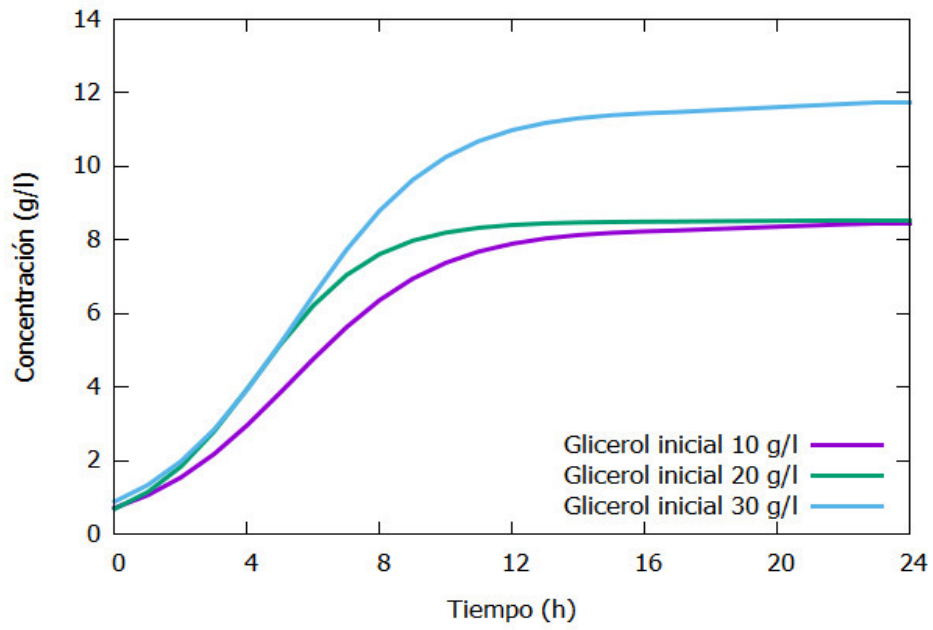


Figura 29. Curva de crecimiento de *Pseudomonas putida* empleando el modelo logístico.
Fuente: Elaboración propia

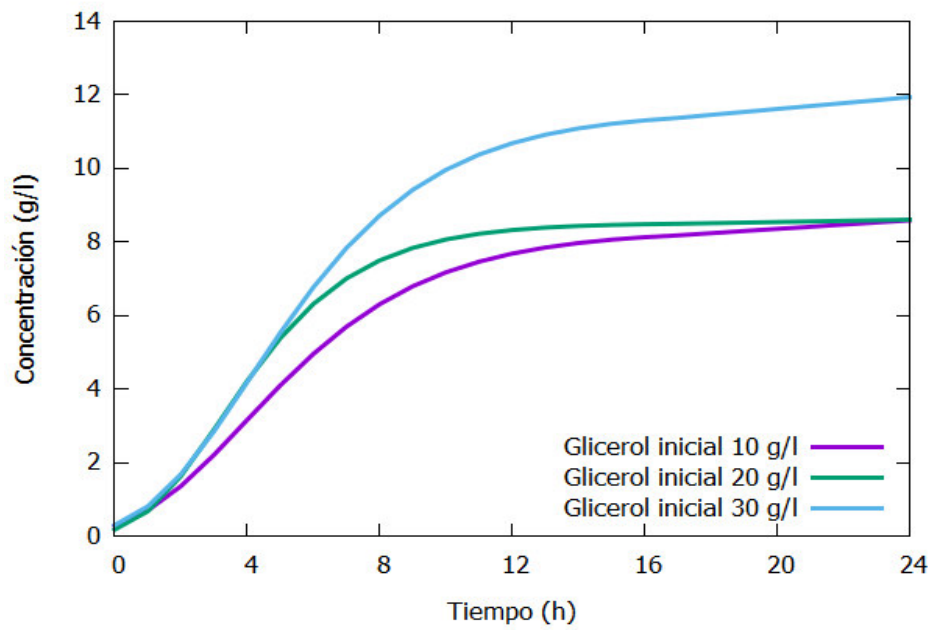


Figura 30. Curva de crecimiento de *Pseudomonas putida* empleando el modelo de Gompertz.
Fuente: Elaboración propia

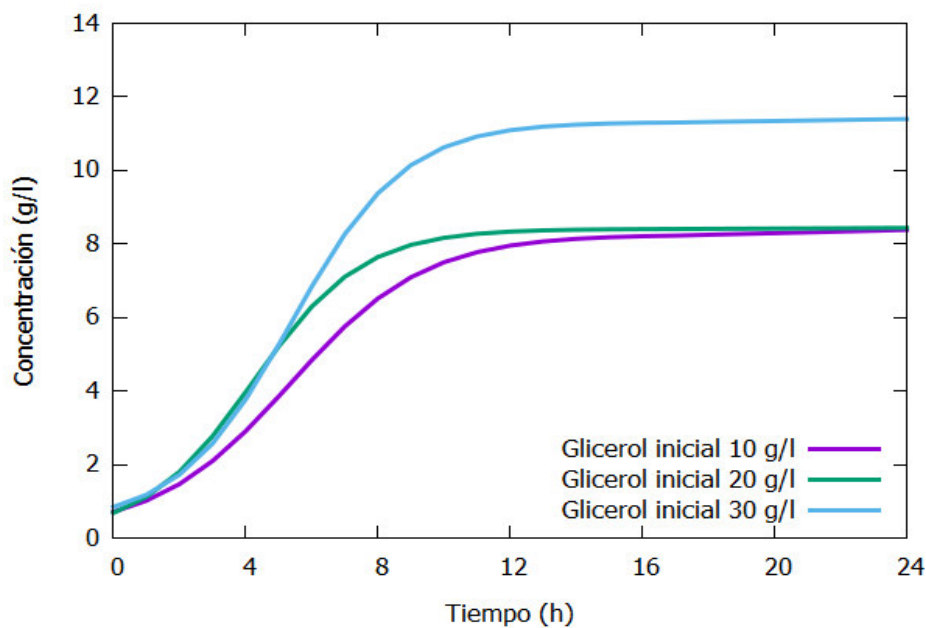


Figura 31. Curva de crecimiento de *Pseudomonas putida* empleando el modelo de Baranyi.
Fuente: Elaboración propia

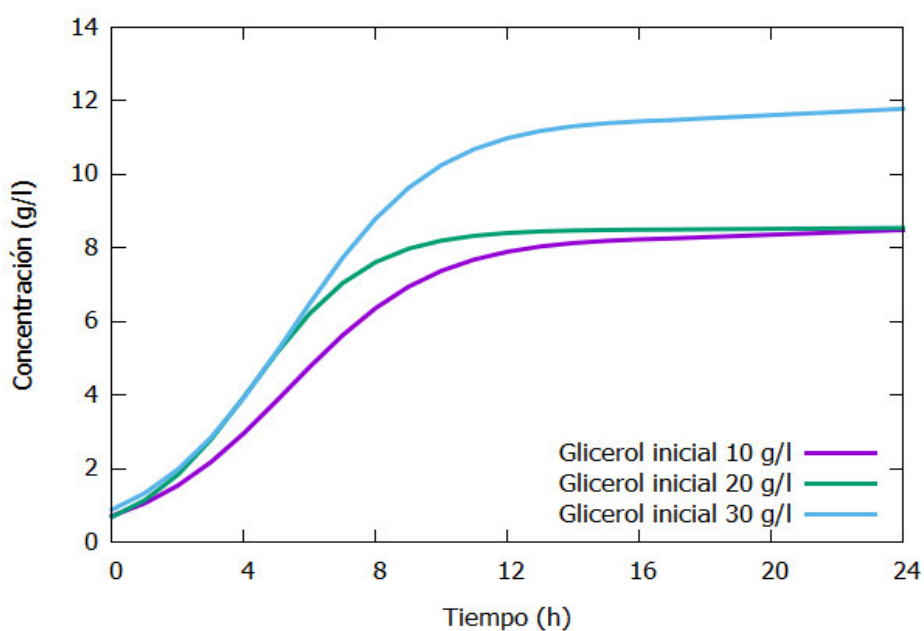


Figura 32. Curva de crecimiento de *Pseudomonas putida* empleando el modelo de estudio.
Fuente: Elaboración propia

Finalmente, para conocer cuál es el modelo que representa mejor crecimiento de *Pseudomonas putida* se tomará en consideración el estadístico S_e , cuyo menor valor representa con mayor fiabilidad el mejor ajuste. La tabla 9 muestra dicho estadístico para cada una de las ecuaciones utilizadas, así como también para cada una de las concentraciones de sustrato inicial. Por lo tanto, el modelo de Baranyi es la que se

ajusta mejor a los datos experimentales contenidos, lo cual concuerda con lo reportado por Zhao et al. (2014), cuyo trabajo concluye que el modelo de Baranyi es el que reproduce mejor los datos experimentales de crecimiento microbiano.

Tabla 9. Valores de S_e para los modelos cinéticos.

Modelo	Valores de S_e		
	Escenario 1	Escenario 2	Escenario 3
Logística	0.4961	1.0911	1.2634
Gompertz	0.5032	1.1026	1.2495
Baranyi	0.0920	0.1381	0.1462
Estudio	0.4961	1.0911	1.2634

4.4. COMPARACIÓN ENTRE MODELOS

Como se anticipó en el punto 3.2 *Cálculos cinéticos* del *Capítulo III*, en caso se encuentre conveniente comparar el modelo obtenido mediante la cinética con algún otro ya establecido empíricamente se procederá a utilizar la serie de Taylor de quinto orden. Para comprobar la convergencia de ambas funciones se debe escoger un punto pivot “a” en el cual las funciones sean diferenciables, para esto se considerará el valor de $a = 8$, puesto que por este punto todas las ecuaciones presentan continuidad.

Es bien sabido que funciones de este tipo (cociente de un exponencial) al ser derivadas varias veces se tornan cada vez más complejas, por lo que únicamente se dejará constancia de las derivadas hasta el tercer orden, sin ser agrupadas en la serie de Taylor, para su posterior tratamiento matemático. Las derivadas fueron obtenidas empleando el software Wolfram Alpha, mediante el cual también, se pudo calcular la serie de Taylor para los puntos definidos.

En el caso del modelo logístico, las derivadas serían las siguientes:

$$\text{Modelo logístico: } y = \frac{A}{1 + e^{\frac{4\mu_{\max}}{A}(\lambda-t)+2}}$$

$$\text{Primera derivada: } \frac{dy}{dt} = \frac{4\mu_{\max} e^{\frac{4\mu_{\max}}{A}(\lambda-t)+2}}{\left[1 + e^{\frac{4\mu_{\max}}{A}(\lambda-t)+2}\right]^2}$$

$$\begin{aligned} \text{Segunda derivada: } \frac{d^2 y}{dt^2} &= A \left\{ \frac{\left(-\frac{4\mu_{\max}}{A} \right)^2 e^{\frac{4\mu_{\max}}{A}(\lambda-t)+2} \left[e^{\frac{4\mu_{\max}}{A}(\lambda-t)+2} - 1 \right]}{\left[1 + e^{\frac{4\mu_{\max}}{A}(\lambda-t)+2} \right]^3} \right\} \\ \text{Tercera derivada: } \frac{d^3 y}{dt^3} &= - \frac{A \left(\frac{4\mu_{\max}}{A} \right)^3 e^{\frac{4\mu_{\max}}{A}(\lambda-t)+2} \left[-4e^{\frac{4\mu_{\max}}{A}(\lambda-t)+2} + e^{2\left[\frac{4\mu_{\max}}{A}(\lambda-t)+2 \right]} + 1 \right]}{\left[1 + e^{\frac{4\mu_{\max}}{A}(\lambda-t)+2} \right]^4} \end{aligned}$$

En el caso del modelo de estudio, las derivadas serían las siguientes:

$$\begin{aligned} \text{Modelo de estudio: } y &= \frac{\gamma}{1 + \psi e^{\eta t}} \\ \text{Primera derivada: } \frac{dy}{dt} &= - \frac{\gamma \psi \eta e^{\eta t}}{(1 + \psi e^{\eta t})^2} \\ \text{Segunda derivada: } \frac{d^2 y}{dx^2} &= \frac{\gamma \psi \eta^2 e^{\eta t} (\psi e^{\eta t} - 1)}{(1 + \psi e^{\eta t})^3} \\ \text{Tercera derivada: } \frac{d^3 y}{dx^3} &= - \frac{\gamma \psi \eta^3 e^{\eta t} (\psi^2 e^{2\eta t} - 4\psi e^{\eta t} + 1)}{(1 + \psi e^{\eta t})^4} \end{aligned}$$

A priori, se observa claras diferencias entre las formas derivadas de ambos modelos; esto se debe a que el modelo logístico se encuentra re-parametrizado, mientras que el modelo de estudio fue parametrizado a posteriori la obtención de la ecuación mediante la cinética y utilizando artificios matemáticos.

Las series de Taylor obtenidas para estos casos (concentraciones de glicerol iniciales) pueden ser revisadas a continuación. Las curvas fueron evaluadas con un valor de significancia $p=0.05$. Las gráficas de las series consideraron el punto pívot $a=8$ y muestran que no existe diferencia significativa entre ambas ecuaciones y que, en el límite (enésima derivada) se puede decir que ambas ecuaciones son las mismas. Por lo tanto, queda demostrado experimentalmente que el modelo experimental

obtenido gracias a la cinética propuesta, describe casi a la perfección el modelo logístico obtenido de manera empírica.

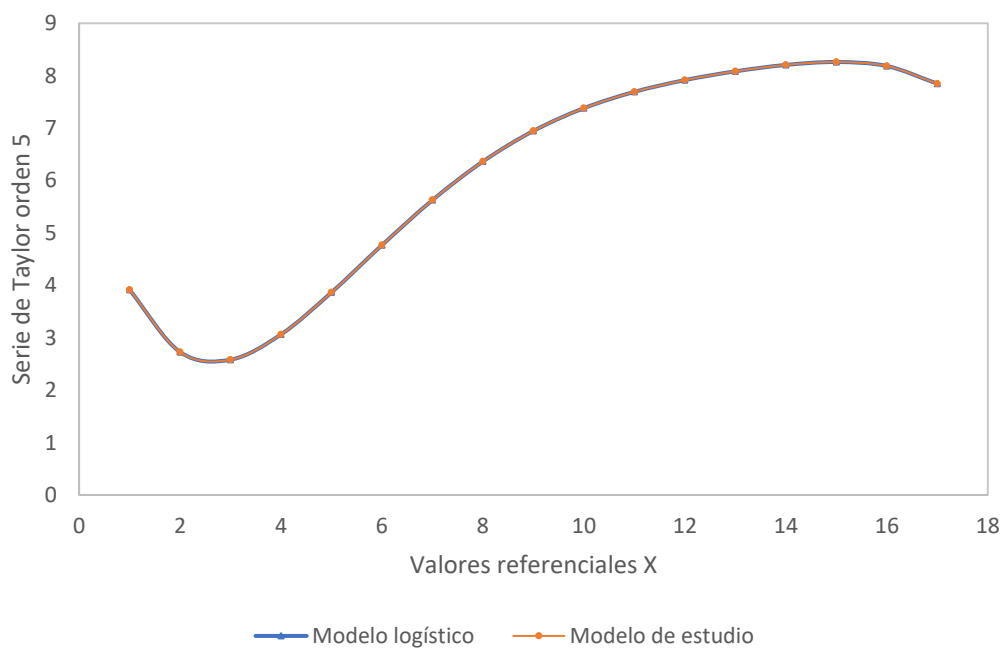


Figura 33. Serie de Taylor comparativa (concentración de sustrato inicial 10 g/l).
Fuente: Elaboración propia

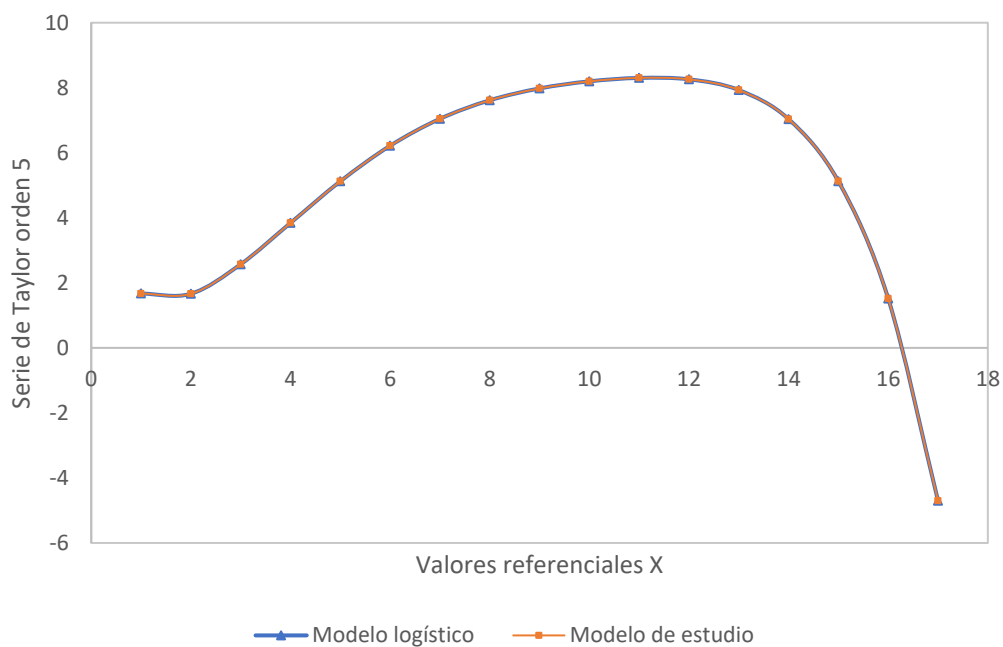


Figura 34. Serie de Taylor comparativa (concentración de sustrato inicial 20 g/l).
Fuente: Elaboración propia

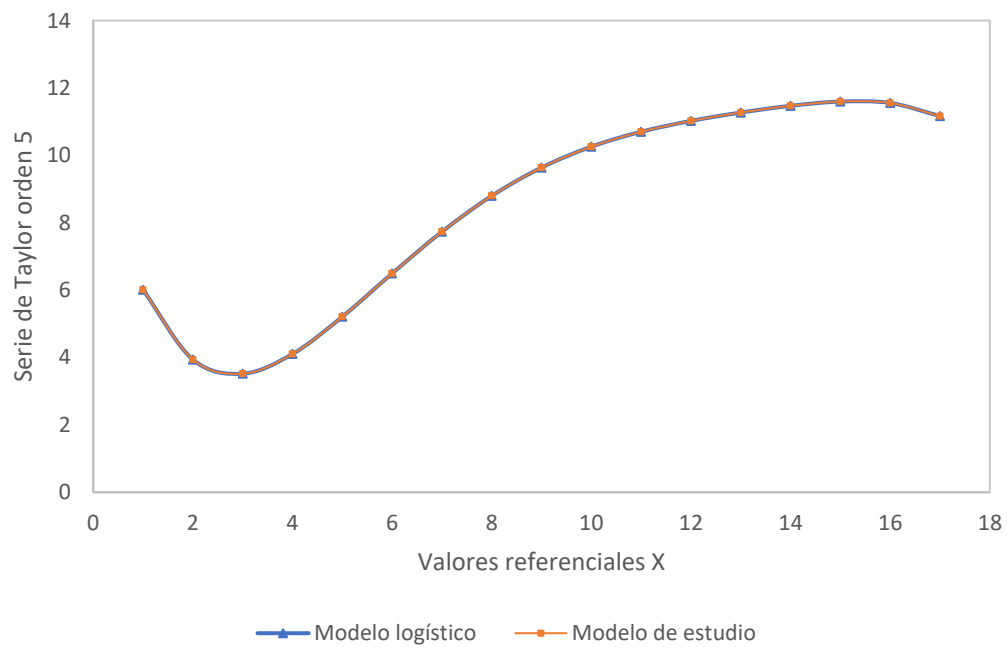


Figura 35. Serie de Taylor comparativa (concentración de sustrato inicial 30 g/l).
Fuente: Elaboración propia

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- 1) A partir del mecanismo cinético propuesto se obtuvo una ecuación que relaciona el crecimiento de la biomasa y el tiempo: $X = \frac{\gamma}{1 + \psi e^{\eta t}}$. Esta expresión representa una nueva herramienta para estudios de temáticas similares, cuyo principal aporte es proveer de fundamento bioquímico a modelos empíricos preexistentes. Adicionalmente, luego de realizar un tratamiento matemático a la ecuación resultante de la cinética, se logró determinar tres parámetros fundamentales: la velocidad de crecimiento específica ($\mu_{\max} = \frac{-\gamma\eta}{4}$), el tiempo de latencia ($\lambda = \frac{2\mu_{\max} \ln \psi^{-1} - \eta\gamma}{2\mu_{\max}\eta}$) y la capacidad del sistema.
- 2) La fenomenología del crecimiento de *Pseudomonas putida*, a partir del mecanismo cinético propuesto, puede ser descrita como un mecanismo pseudomolecular, en el cual la biomasa consume el sustrato para formar primero un complejo intermediario; seguidamente este se transforma en un segundo complejo intermediario y entran ambos en equilibrio; el primer complejo intermediario (por medio de reacciones intracelulares) se convierte en la biomasa final con biopolímero dentro de ella y libera parte del sustrato sin ser consumido; finalmente, el segundo complejo intermediario deviene en un producto extracelular -para fines prácticos, este se considera inexistente- y sustrato.
- 3) Se identificó como el paso limitante en el mecanismo a la reacción de formación de un producto extracelular; el cual no ha sido identificado ni postulado debido a que se requerirían muchas pruebas para determinar su composición. Asimismo, la concentración de este producto se considera mínima o inexistente para otorgar mayor consistencia al modelo propuesto.
- 4) La ecuación resultante del mecanismo cinético propuesto representa al modelo logístico. Esto fue corroborado gracias a la serie de Taylor aplicada en el punto pívot $a = 8$, en donde ambas ecuaciones presentan continuidad. Esto otorga sustento bioquímico a un modelo netamente empírico.
- 5) La cepa de *Pseudomonas putida* ATCC 31483 estudiada ha evidenciado un comportamiento distinto en cada uno de los medios experimentales (concentración de glicerol de 10, 20 y 30 g/l). Generalmente, los parámetros tales como velocidad de

crecimiento específica, capacidad del sistema (en biomasa) y tiempo de generación, son crecientes conforme aumenta la concentración del sustrato limitante. Asimismo, el medio que generó la mayor cantidad de biomasa durante todo el experimento fue el que tuvo la concentración inicial mayor del sustrato limitante, siendo esta de 30 g/l de glicerol.

- 6) El modelo de Baranyi es la que mejor describe los datos experimentales, debido a que la desviación estándar de la distancia entre los valores de datos y los valores ajustados (S_e) es menor para este modelo que para los otros empleados (logístico, Gompertz y de estudio).

RECOMENDACIONES

- 1) Postular nuevos mecanismos de reacción que abarquen las rutas metabólicas conocidas para la formación de biopolímero tipo PHA en *Pseudomonas putida* y otros microorganismos de potencial biotecnológico.
- 2) Realizar pruebas a diferentes temperaturas y/o probar nuevos sustratos con la finalidad de determinar las condiciones óptimas en las que los datos experimentales puedan ser ajustados al mecanismo propuesto.
- 3) Hacer ensayos en diversos tipos de biorreactores para definir cuál de estos es el más adecuado para este tipo de cultivo.
- 4) Tomar muestras de biomasa en cortos intervalos de tiempo con el fin de trazar de modo más preciso la etapa de crecimiento exponencial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS

- Albornoz, P. (2015). *Ajuste de modelos matemáticos no lineales y su uso en cinéticas de inactivación de Escherichia coli ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria por medio de pasteurización asistida con ultrasonido* (Tesis de maestría). Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Almudena, M. (1999). *Desarrollo de Modelos Cinéticos para Bioprocesos: Aplicación a la Producción de Xantano* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Augustin, J. y Carlier, V. (2000). Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, (56), 29–51. Doi: 10.1016/S0168-1605(00)00223-3.
- Baranyi, J. y Roberts, T. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, (23), 277-294. Doi: 10.1016/0168-1605(94)90157-0.
- Baranyi, J. (1997). Simple is good as long as it is enough. *Food Microbiology*, (14), 189-192. Doi: 10.1006/fmic.1996.0080.
- Becerra, M. (2013). *Producción de un Polímero tipo Polihidroxialcanoato (PHA) empleando Residuos de la Producción de Biodiesel* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Bolívar, F. (Ed.) (2007). *Fundamentos y casos exitosos de la Biotecnología*. México D.F., México: El Colegio Nacional.
- Castillo, D. (2008). *Efecto del gen fadH1 en la producción de PHA conteniendo monómeros insaturados por Pseudomonas putida* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Sao Paulo, Brasil.
- Carrillo, M., Zavala, D. y Alvarado, B. (2007). Modelado del Efecto de la Temperatura, Actividad de Agua y pH sobre el Crecimiento de *Rhizopus oryzae*. *Información Tecnológica*, 18(4), 57-62. Doi: 10.4067/S0718-07642007000400009.
- Cayré, M., Vignolo, G. y Garro, O. (2007). Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas y *Brochothrix*

- thermosphacta sobre Emulsiones Cárnicas Cocidas. *Información Tecnológica*, 18(3), 23-29. Doi: 10.4067/S0718-07642007000300004.
- Davis, M y Davis, R. (2003). *Fundamentals of Chemical Reaction Engineering*. New York, Estados Unidos: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Devore, J. (2008). *Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias*. México D.F., México: CENGAGE Learning.
- Doran, P. (2013). *Bioprocess Engineering Principles*. Waltham, Estados Unidos: Elsevier Ltd.
- Dos Santos, A. (2007). *Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Duarte, A. (1995). *Introducción a la Ingeniería Bioquímica*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Duffy, L., Vanderlinde, P. y Grau, F. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, aw, nitrite and ascorbate. *International Journal of Food Microbiology*, (23), 377-390. Doi: 10.1016/0168-1605(94)90164-3.
- Edwards, C. y Penney, D. (2009). *Ecuaciones diferenciales y problemas con valores en la frontera*. México D.F., México: Pearson Educación.
- Fakruddin, M., Mazumder, R. y Bin Mannan, K. (2011). Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)*, 40 (2), 121-131. Doi: 10.4038/cjsbs.v40i2.3928.
- Fernández, I. (2012). *Estudio del metabolismo de polihidroxicanoatos en Pseudomonas putida: implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos funcionalizados* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Fysun, O., Stoeckel, M., Thienel, K., Wäschle, F., Palzer, S. y Hinrichs, J. (2015). Prediction of Water Activity in Aqueous Polyol Solutions. *Chemie IngenieurTechnik*, 87(10), 1327-1333. Doi: 10.1002/cite.201400134.

- González, Y., Meza, J., González, O. y Córdova, J. (2013). Síntesis y Biodegradación de Polihidroxialcanoatos: Plásticos de Origen Microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29(1), 77-115. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v29n1/>
- Grijpspeerdt, K. y Vanrolleghem, P. (1999). Estimating the parameters of the Baranyi model for bacterial growth. *Food Microbiology*, (16), 593-605. Doi: 10.1006/fmic.1999.0285.
- Harder, A. y Röels, J. (1982). Application of Simple Structured Models in Bioengineering. Microbes and Engineering Aspects. *Advances in Biochemical Engineering*, (21), 55-107. Doi: 10.1007/3-540-11019-4_6.
- Jeong, J., Snay, J. y Ataai, M. (1989). A Mathematical Model for Examining Growth and Sporulation Processes of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, (35), 160-184. Doi: 10.1002/bit.260350208.
- Kato, M., Bao, H., Kang, C., Fukui, T. y Doi, Y. (1996). Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (45), 363-370. Doi: 10.1007/s002530050.
- Levine, I. (2004). *Fisicoquímica*. Madrid, España: McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U.
- Liu, Q., Luo, G., Zhou, X. y Chen, G. (2011). Biosynthesis of poly (3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating poly hydroxyalkanoates by β -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. *Metabolic Engineering*, (13), 11-17. Doi: 10.1016/j.ymben.2010.10.00.
- Lobry, J. (1991). *Réévaluation du modèle de croissance de Monod. Effet des antibiotiques sur l'énergie de maintenance* (Tesis doctoral). Université Claude Bernard - Lyon I, Lyon, Francia.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaise, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, S. y Darnell, J. (2005). *Biología Celular y Molecular*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.

- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G. y Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1), 10-18. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/rid>
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. y Clark D. (2009). *Brock, Biología de los Microorganismos*. Madrid, España: Pearson Education, S.A.
- Málek, I. y Beran, K. (1962). Continuous Cultivation of Microorganisms: A Review. *Folia Microbiologica*, (7), 388-411. Doi: 10.1007/BF02928128.
- Mathews, C., Van Holde, K. y Ahern, K. (2002). *Bioquímica*. Madrid, España: Editorial Pearson Education S.A.
- Mayz, J. y Manzi, L. (2017). Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizosfera de *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(1), 29-37. Doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57408.
- McMeekin, T., Olley, J., Ratkowsky, D., Corkrey, R. y Ross, T. (2013). Predictive microbiology theory and application: Is it all about rates? *Food Control*, (29), 290-299. Doi: 10.1016/j.foodcont.2012.06.001.
- Monod, J. (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, (3), 371-394. Recuperado de <https://www.annualreviews.org/toc/micro/3/1>
- Najafpour, G. (2015). *Biochemical engineering and biotechnology*. Amsterdam, Países Bajos: Elsevier B.V.
- Nielsen, J., Nikolajsen, K. y Villadsen, J. (1990). Structured Modeling of a Microbial System: 1. A Theoretical Study of Lactic Acid Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, (38), 1-10. Doi: 10.1002/bit.260380102.
- Ossa, J., Vanegas, M. y Badillo, A. (2010). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 13(1), 97-104. Recuperado de www.scielo.org.co/pdf/rudca/v13n1/v13n1a11.pdf
- Pérez, I. y Silveira, E. (2007). La dinámica bacteriana desde el punto de vista biofísico (Bacterial dynamics from the biophysical point of view). *Revista electrónica de Veterinaria*, 8(9), 1-6. Recuperado de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

- Pons, A., Roca, P., Aguiló, C., García, F., Alemany, M. y Palou, A. (1980). A method for the simultaneous determination of total carbohydrate and glycerol in biological samples with the anthrone reagent. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, (4), 227-231. Doi: 10.1016/0165-022X(81)90060-9.
- Roussos, S. y Perraud-Gaime, I. (1996). Fisiología y Bioquímica de Microorganismos utilizados en procesos de Fermentación en Medio Sólido. *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*, 341-348.
- Shang, L., Jiang, M., Yun, Z., Yan, H. y Chang, H. (2008). Mass production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from hydrolyzed corn oil by fed-batch culture of *Pseudomonas putida*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (24), 2783-2787. Doi: 10.1007/s11274-008-9808-1.
- Shankar, A., D'Souza, S., Narvekar, M., Rao, P. y Tembadmani, K. (2015). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from novel sources: A Review. *International Journal of Research in Biosciences*, 4(4), 16-28. Recuperado de <http://www.ijrbs.in>
- Tempest, D. (1970). The Continuous Cultivation of Micro-organisms. *Methods in Microbiology*, (2), 259-276. Doi: 10.1016/S0580-9517(08)70226-5
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D., McMeekin, T. y Ross, T. (2000). Growth Limits of *Listeria monocytogenes* as a Function of Temperature, pH, NaCl, and Lactic Acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(11), 4979-4987. Doi: 10.1128/AEM.66.11.4979-4987.2000.
- Trinidad, A. (2014). *Modelos de Crecimiento en Biología, su significado Biológico y Selección del Modelo por su ajuste* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F., México.
- Vanegas, D. y Ramírez, M. (2016). Correlación del Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en la Producción de Polihidroxialcanoatos de Cadena Media (PHAMCL) mediante Modelos Primarios de Gompertz, Logístico y Baranyi. *Información Tecnológica*, 27(2), 87-96. Doi: 10.4067/S0718-07642016000200011.
- Varma, A., Boesch, B. y Palsson, B. (1993). Stoichiometric Interpretation of *Escherichia coli* Glucose Catabolism under Various Oxygenation Rates. *Applied*

- and Environmental Microbiology*, 59(8), 2465-2473. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182307/>
- Williams, S., Martin, D., Horowitz, D. y Peoples, O. (1998). PHA applications: addressing the price performance issue I. Tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, (25), 111-121. Doi: 10.1016/S0141-8130(99)00022-7.
- Zhao, J., Gao, J., Chen, F., Ren, F., Dai, R., Lui, Y. y Li, X. (2014). Modeling and predicting the effect of temperature on the growth of *Proteus mirabilis* in chicken. *Journal of Microbiological Methods*, (99), 38-43. Doi: 10.1016/j.mimet.2014.01.016.
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F. y Van't Riet, K. (1990). Modeling of Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875-1881. Recuperado de <http://aem.asm.org/content/>

ANEXOS

ANEXO A. Cuadro de producción de PHA a partir de diversos sustratos y cepas microbianas (González et al., 2013)

Microorganismo	Sustrato	Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	PHA		Referencia
				(g/L)	(%)	
Bacterias						
<i>Aeromonas hydrophyla</i> 4Ak4	Ácido láurico, 1,4 butanediol	72	3.3		23.6	Xie y Chen (2007)
<i>Aeromonas hydrophyla</i> 4AK4	Dodecanoato, propionato	60	2.7		37.2	Zhao <i>et al.</i> (2007)
<i>Aeromonas hydrophyla</i> CQ4	Dodecanoato, gluconato	48	4.5		44.7	Qin <i>et al.</i> (2007)
<i>Alcaligenes latus</i>	Residuos de malta	69			70.1	Cai <i>et al.</i> (2008)
<i>Alcaligenes latus</i>	Jugo de maple				77	Yezza <i>et al.</i> (2007)
<i>Alcaligenes latus</i>	Sacarosa + propiónico		4.7	1.9	43	Ramsay <i>et al.</i> (1990)
<i>Alcaligenes latus</i>	Sacarosa		112	98.5	88	Wang y Lee (1997a)
<i>Alcaligenes latus</i>	Sacarosa	18	143	71.5	50	Yamane <i>et al.</i> (1996)
<i>Azotobacter beijerinckii</i> 9067	Glucosa				70.4	Stockdale <i>et al.</i> (1968)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Almidón	70	54	24.8	46	Kim y Chang (1998)
<i>Azotobacter chroococcum</i> H23	Alpechín		5.7		50.6	González López (1996)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Glucosa + peptona pescado		30	25.5	85	Page <i>et al.</i> (1997)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Sacarosa	47	40	31.9	79.8	Page y Comish (1993)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Melazas	36			66	Page (1992)
<i>Bacillus cereus</i> EGU3	Glucosa	20	0.8	0.5	66.6	Porwal <i>et al.</i> (2008)
<i>Bacillus megaterium</i> SRKP-3.	Residuos lácteos	36		11.3		Pandian <i>et al.</i> (2010)
<i>Bacillus mycoides</i> RLJ B-017	Sacarosa				69	Borah <i>et al.</i> (2002)
<i>Bacillus sphaericus</i> NCIM 5149	Hidrolizado de semillas		4.5	2.2		Ramadas <i>et al.</i> (2009)
<i>Bacillus spp.</i>	Decanoato	24		0.4	80	Valappil <i>et al.</i> (2007)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Hidrolizado hemicelulosas			2	40	Keenan <i>et al.</i> (2006)
<i>Burkholderia sacchari</i>	Sacarosa		150		42	da Cruz Pradella <i>et al.</i> (2010)
<i>Caulobacter crescentus</i>	Glucosa				18	Qingsheng y Bernd (2001)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Ácido valérico		41	26.6	65	Steinbüchel <i>et al.</i> (1993)
<i>Comamonas</i> sp. EB172	Efluente aceite de palma				44	Zakaria <i>et al.</i> (2008)
<i>Cupriavidus necator</i>	Glucosa				77	Atlic <i>et al.</i> (2011)
<i>Cupriavidus necator</i>	Residuos líquidos de alimentos				87	Hafuka <i>et al.</i> (2011)
<i>Cupriavidus necator</i>	Aceite vegetal y propanol		138	105		Obruca <i>et al.</i> (2010)
<i>Cupriavidus necator</i>	Ácidos grasos volátiles					Wang <i>et al.</i> (2010)
<i>Cupriavidus necator</i> h16	Aceite de plantas		4.4	6.8	80	Ng <i>et al.</i> (2010)
<i>Cupriavidus nécator</i> jmp 134	Glicerol crudo		50		48	Mothes <i>et al.</i> (2007)
<i>Cupriavidus</i> sp. USMAA 1020	Gama butirolactona	48	4		52.4	Amirul <i>et al.</i> (2008)
<i>Enterobacter cloacae</i> SU-1	Lactosa				94	Samrot <i>et al.</i> (2011)
<i>Methylobacterium organophilum</i>	Metanol	70	250	130	52	Kim <i>et al.</i> (1996)
<i>Methylobacterium rhodesianum</i>	Glicerol	45			50	Bormann <i>et al.</i> (1999)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Agua residual de <i>Cassava</i>				39	Costa <i>et al.</i> (2009)
<i>Pseudomonas guezenei</i>	Aceite de copra	36			63	Simon-Colin <i>et al.</i> (2008)
<i>Pseudomonas hydrogenovora</i>	Suero de leche				12	Koller <i>et al.</i> (2008)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Octano				37.2	Brandl <i>et al.</i> 1988
<i>Pseudomonas oleovorans</i> M26	Glucosa	46		3.27	31.4	Huang D.H <i>et al.</i> (2006)

Continúa

Microorganismo	Sustrato	Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	PHA		Referencia
				(g/L)	(%)	
<i>Pseudomonas pseudoflava</i>	Pentosas				17	Bertrand <i>et al.</i> (1990)
<i>Pseudomonas putida</i>	Aceite de maíz		103	28	27.2	Shang <i>et al.</i> (2008)
<i>Pseudomonas putida</i> KTOY06	Dodecanoato, gluconato	48	5.3		84.3	Ouyang <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudomonas</i> SK	Metanol		233	149.1	64	Suzuki <i>et al.</i> (1986)
<i>Ralstonia eutrophica</i>	Aceite de soya		32		86	Park y Kim (2011)
<i>Ralstonia eutrophica</i>	Glucosa	50	164	124.6	76	Kim <i>et al.</i> (1994a)
<i>Ralstonia eutrophica</i>	Glucosa/propiónico	46	158	116.9	74	Kim <i>et al.</i> (1994b)
<i>Ralstonia eutrophica</i>	Tapioca hidrolizada	59	106	61.4	58	Kim y Chang (1995)
<i>Ralstonia eutrophica</i>	Glucosa	74	281	230.4	82	Ryu <i>et al.</i> (1997)
<i>Ralstonia eutrophica</i>	Bagazo caña hidrolizado		11		56.5	Yu <i>et al.</i> (2008)
<i>Ralstonia eutrophica</i>	Gluconato, octanoato	48	5.1		40.9	Chen <i>et al.</i> (2007)
<i>Ralstonia eutrophica</i>	Fructosa	72	3.7		68.4	Zheng <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Acético				95	Sangkharak <i>et al.</i> (2007)
<i>Serratia</i> sp.	Citrato y glicerol				55	Lugg <i>et al.</i> (2008)
<i>Wautersia eutrophica</i>	Gluconato de sodio					Isemori <i>et al.</i> (2006)
<i>Wautersia eutrophica</i>	Aceite de canola			18.2	90	López-Cuéllar <i>et al.</i> (2011)
<i>Wautersia eutrophica</i>	Fructosa	60	14	6		Patwardhan y Srivastava (2008)
<i>Zobellella denitrificans</i> MW1	Glicerol				70	Ibrahim y Steinbüchel (2009)
<i>Zooglea</i> sp.1 GY3	Sacarosa	32		9.4		Yang y Huang (2006)
Bacterias halófilas						
<i>Halomonas boliviensis</i>	Almidón hidrolizado				50	Quillaguaman <i>et al.</i> (2005)
<i>Halomonas boliviensis</i> LC1	Sacarosa	19	14		54	Quillaguaman <i>et al.</i> (2007)
<i>Halomonas campisalis</i> B-1027	Maltosa	30			45	Kulkarni <i>et al.</i> (2010)
<i>Halomonas</i> TD01	Glucosa	56	80		80	Tan <i>et al.</i> (2011)
<i>Saccharophagus degradans</i>	Almidón	48			25	González-García <i>et al.</i> (2010)
Cultivos mixtos						
Lodos activados aerobios	Aguas residuales				48.2	Bengtsson y Werker (2008)
Lodos anaerobios	Efluentes industriales	96			58	Khardenavis <i>et al.</i> (2009)
Arqueas						
<i>Haloferax mediterranei</i>	Glucosa			3	31	García Lillo <i>et al.</i> (1990)
<i>Haloferax mediterranei</i>	Almidón hidrolizado		140	77.8	56	Huang <i>et al.</i> (2006)

ANEXO B. Matriz de consistencia del experimento.

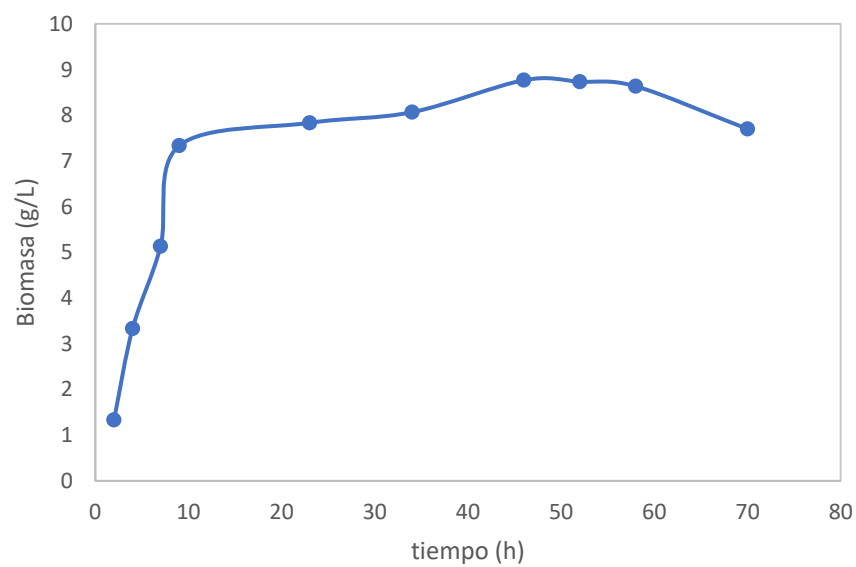
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES
<p>PROBLEMA GENERAL</p> <p>¿Los modelos matemáticos que describen el crecimiento bacteriano tienen sustento bioquímico?</p> <p>PROBLEMAS ESPECÍFICOS</p> <p>a. ¿Mediante qué mecanismo el microorganismo aumenta en biomasa?</p> <p>b. ¿Qué sustancia es la precursora del biopolímero?</p> <p>c. ¿En algún paso actuará alguna enzima?</p> <p>d. ¿El biopolímero se acumulará únicamente dentro de la célula?</p>	<p>OBJETIVO GENERAL</p> <p>Desarrollar una ecuación de velocidad que describa el crecimiento en biomasa de <i>Pseudomonas putida</i> utilizando glicerol como fuente de sustrato.</p> <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</p> <p>a. Detallar la fenomenología del crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> sobre glicerol, formulando un mecanismo pseudomolecular plausible, para generar una expresión que describa la cinética de dicha gestión bioquímica.</p> <p>b. Identificar la etapa limitante en el mecanismo cinético propuesto.</p> <p>c. Obtener los parámetros cinéticos del crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> a partir del tratamiento matemático de la ecuación obtenida.</p> <p>d. Establecer una comparación cuantitativa entre los parámetros cinéticos obtenidos de la ecuación resultante del mecanismo cinético propuesto y de los modelos cinéticos existentes.</p>	<p>HIPÓTESIS GENERAL</p> <p>Es posible predecir la velocidad de crecimiento específica en biomasa de <i>Pseudomonas putida</i> a partir de la solución matemática de un mecanismo cinético bioquímico propuesto.</p> <p>HIPÓTESIS ESPECÍFICA</p> <ul style="list-style-type: none"> La etapa limitante en el mecanismo bioquímico es la etapa de formación del complejo que precede a la formación del biopolímero. 	<p>VARIABLES DE ESTUDIO</p> <p>VARIABLE DEPENDIENTE</p> <p>Biomasa</p> <p>Indicadores</p> <ul style="list-style-type: none"> Concentración de biomasa (g/L) <p>VARIABLES INDEPENDIENTES</p> <ul style="list-style-type: none"> Glicerol Amonio <p>Indicadores</p> <ul style="list-style-type: none"> Relación C/N Concentración de sustrato limitante

ANEXO C. Datos experimentales

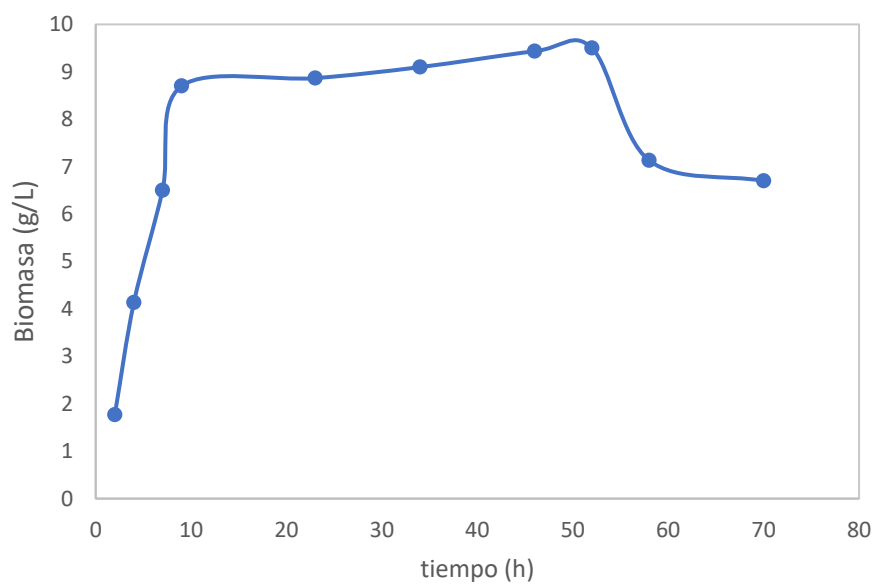
C.1 Tabla de datos

Concentración de glicerol (g/l)			t (h)
10	20	30	
1.333	1.767	1.500	2
3.333	4.133	4.500	4
5.133	6.500	7.333	7
7.333	8.700	9.833	9
7.833	8.867	10.433	23
8.067	9.100	11.200	34
8.767	9.433	13.300	46
8.733	9.500	9.433	52
8.633	7.133	12.500	58
7.700	6.700	12.333	70

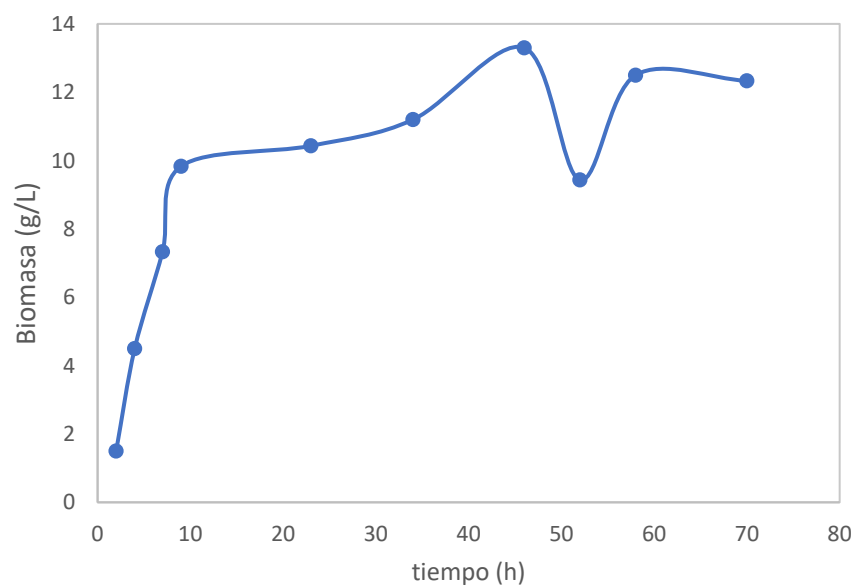
C.2 Gráfica de crecimiento experimental de biomasa (escenario 1)



C.3 Gráfica de crecimiento experimental de biomasa (escenario 2)

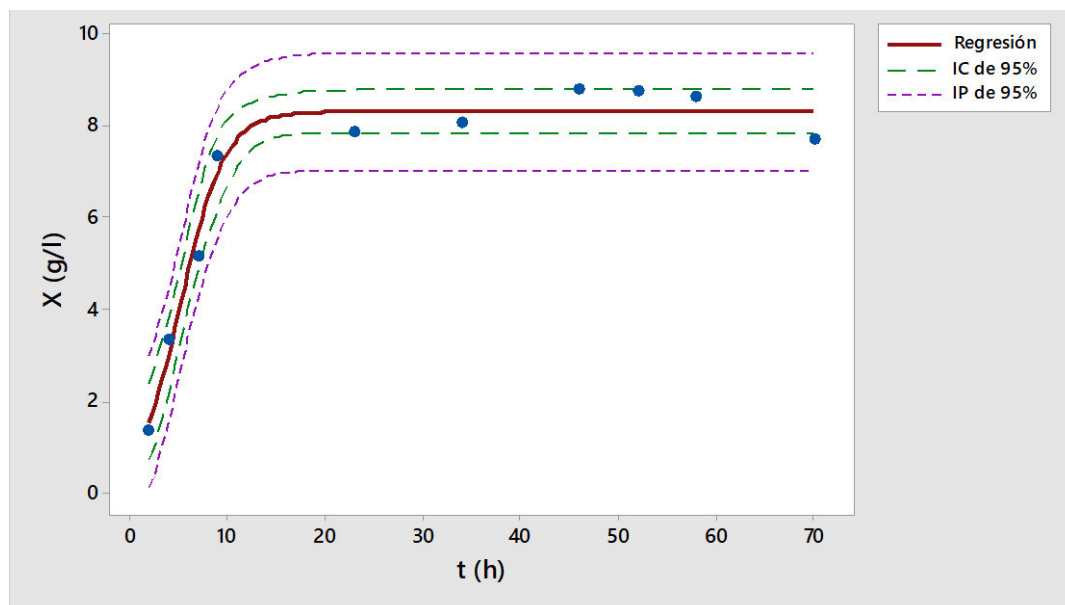


C.4 Gráfica de crecimiento experimental de biomasa (escenario 3)

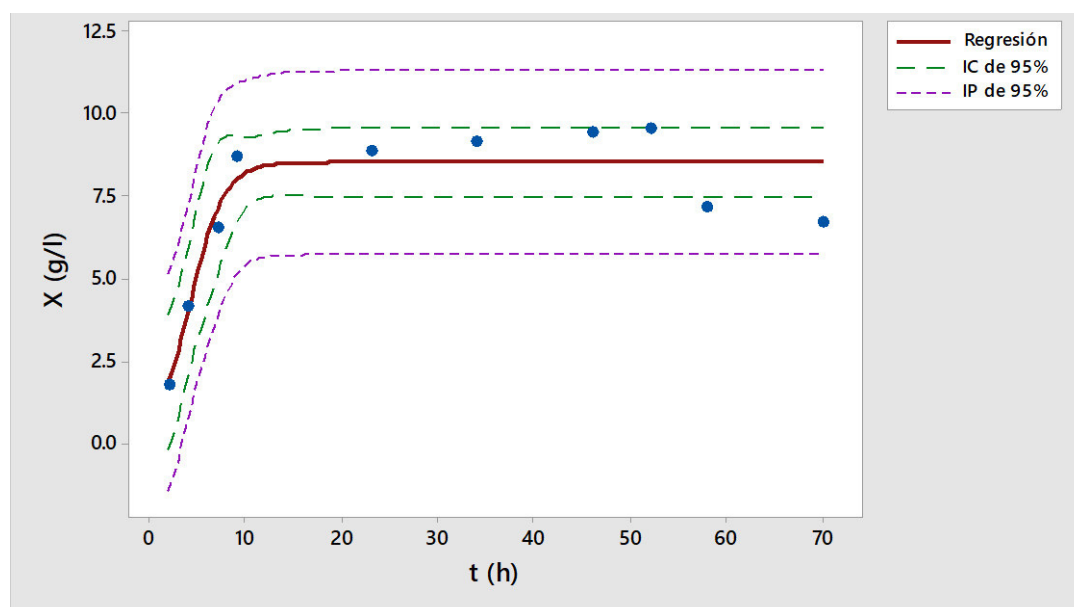


ANEXO D. Curvas de ajuste de los datos experimentales utilizando Minitab

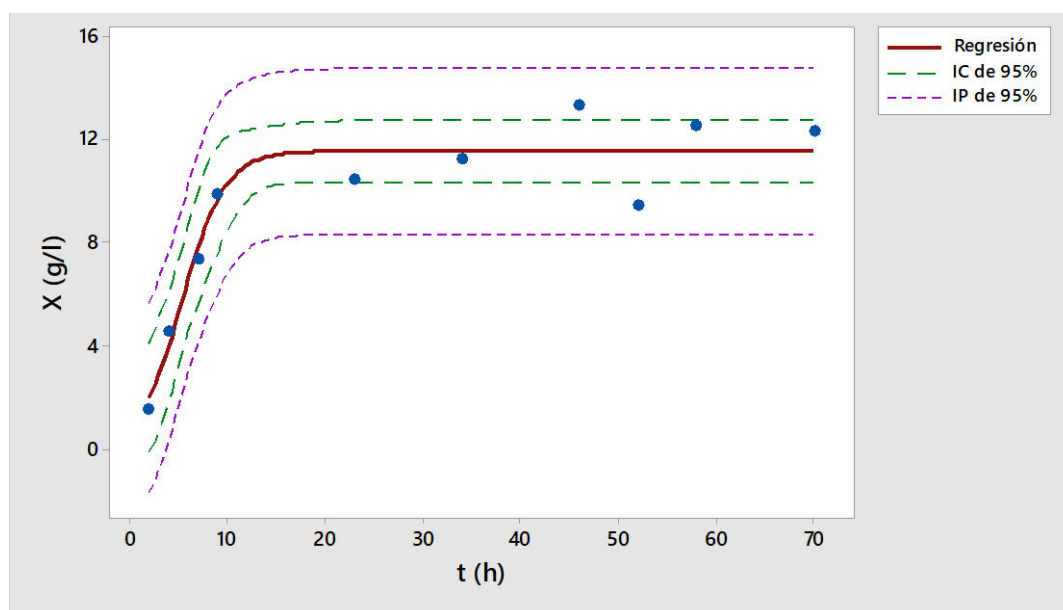
D.1 Gráficas de ajuste para el modelo logístico (escenario 1)



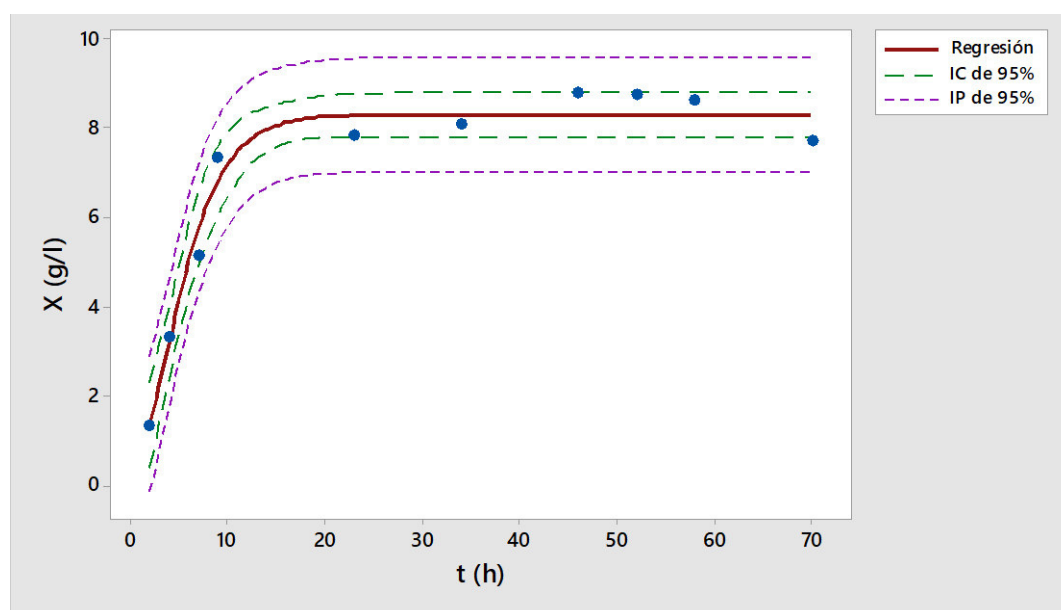
D.2 Gráficas de ajuste para el modelo logístico (escenario 2)



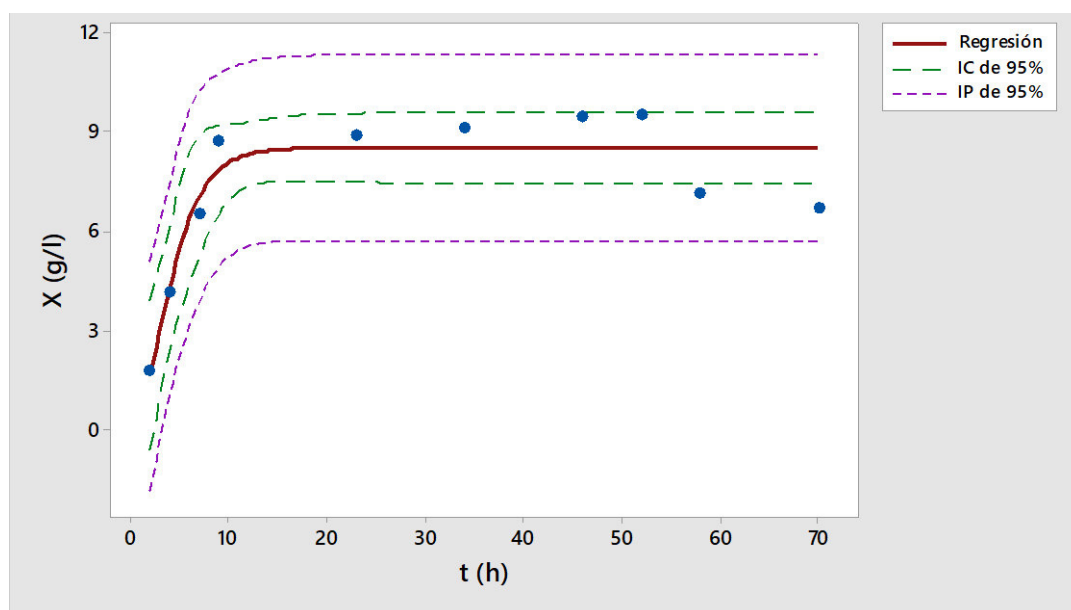
D.3 Gráficas de ajuste para el modelo logístico (escenario 3)



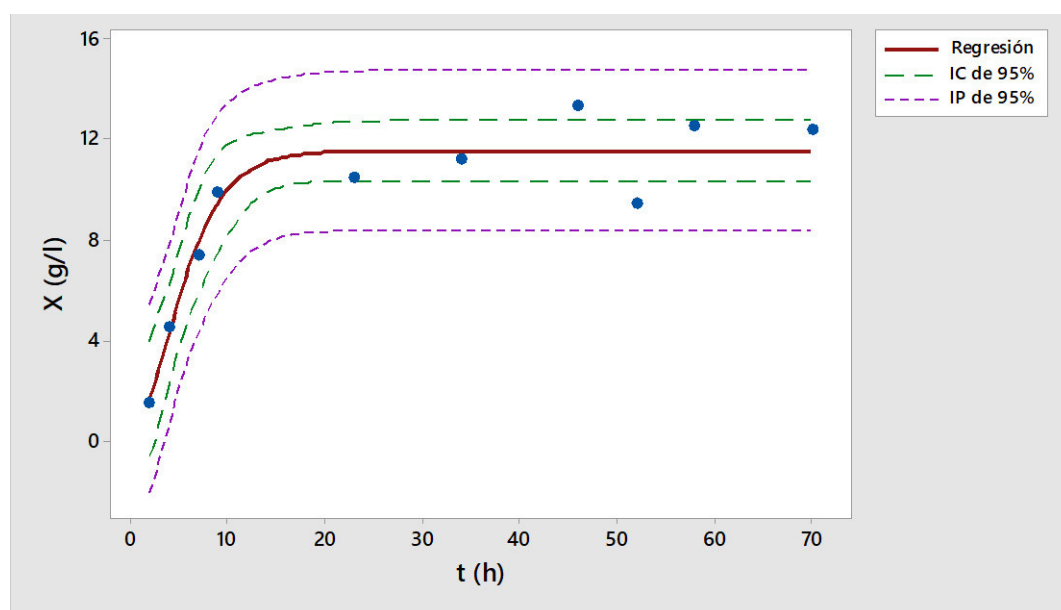
D.4 Gráficas de ajuste para el modelo de Gompertz (escenario 1)



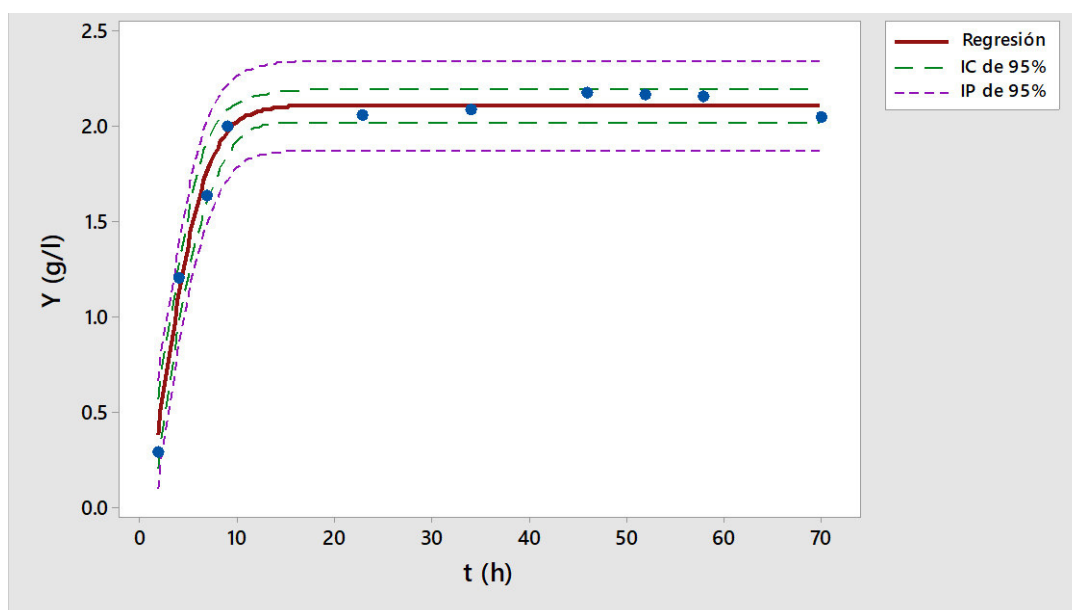
D.5 Gráficas de ajuste para el modelo de Gompertz (escenario 2)



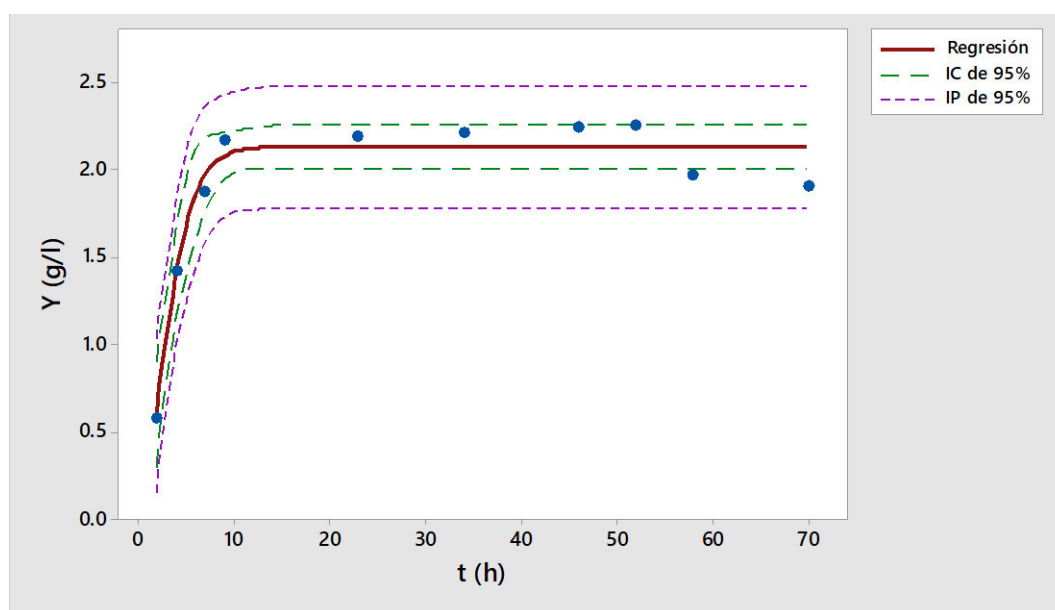
D.6 Gráficas de ajuste para el modelo de Gompertz (escenario 3)



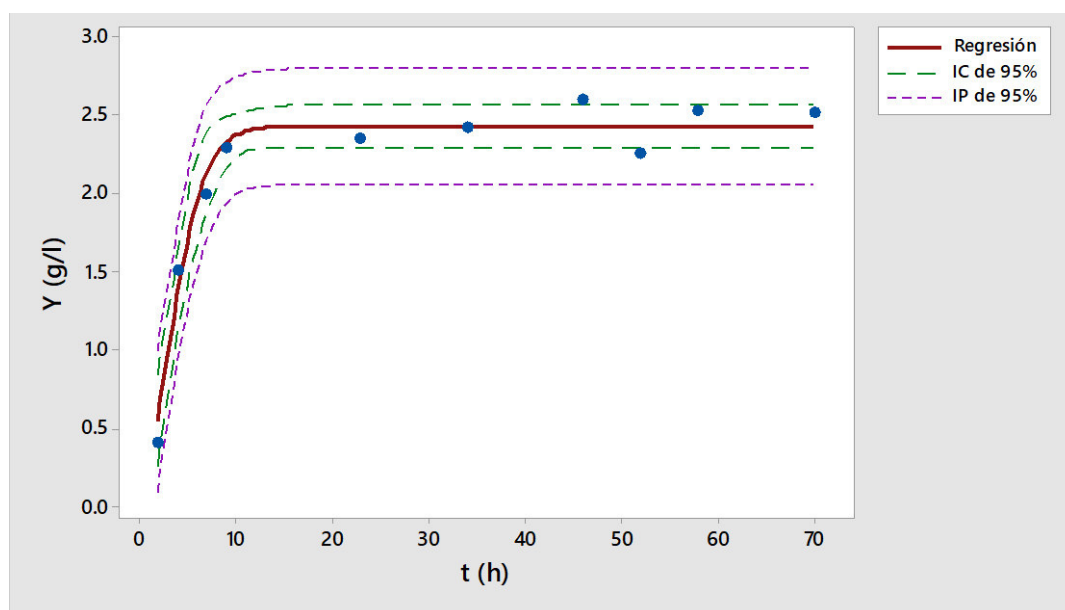
D.7 Gráficas de ajuste para el modelo de Baranyi (escenario 1)



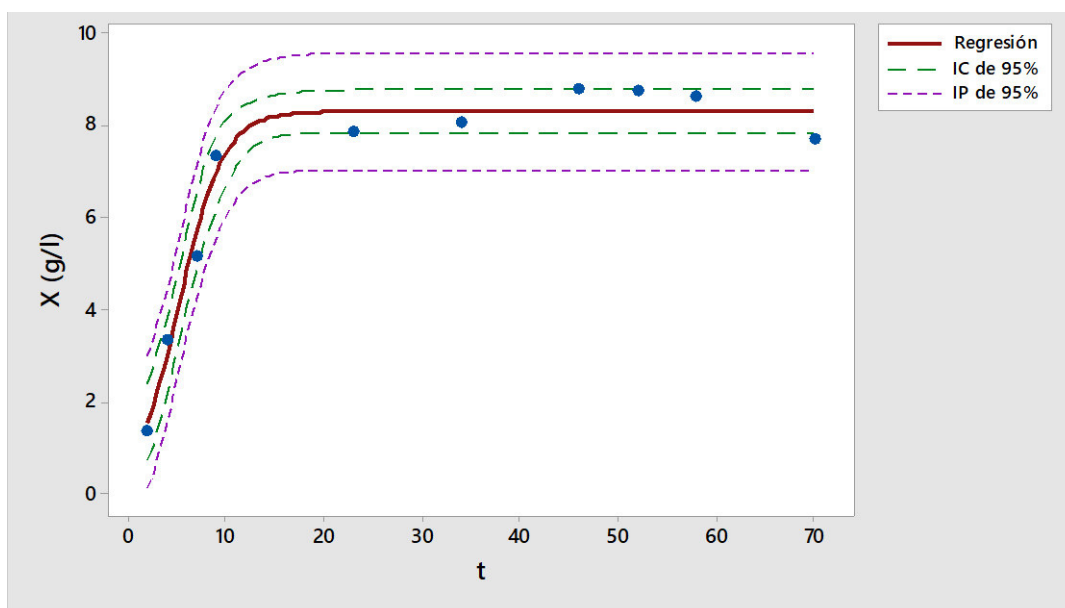
D.8 Gráficas de ajuste para el modelo de Baranyi (escenario 2)



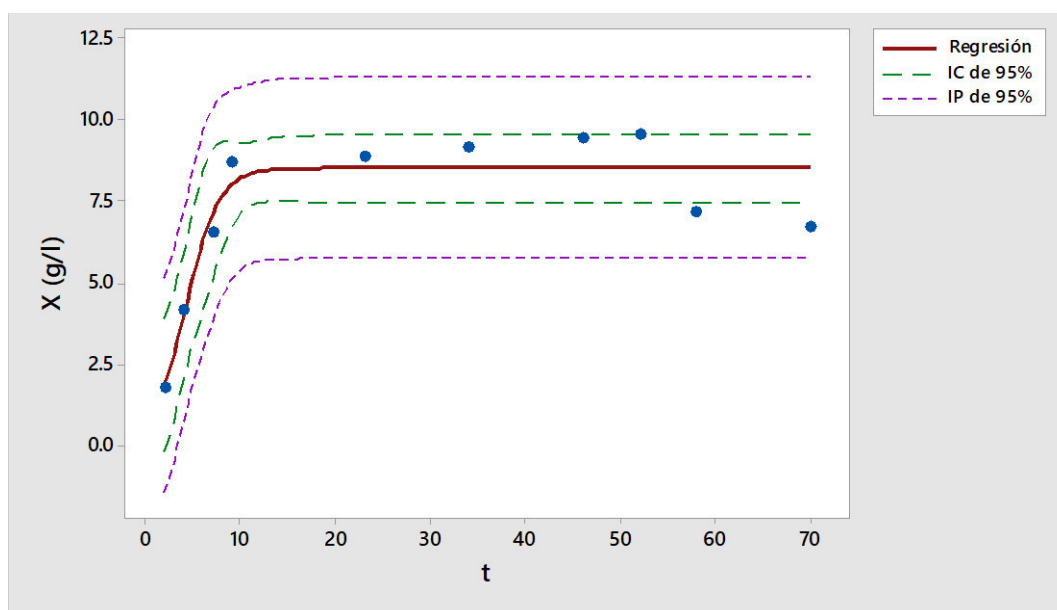
D.9 Gráficas de ajuste para el modelo de Baranyi (escenario 3)



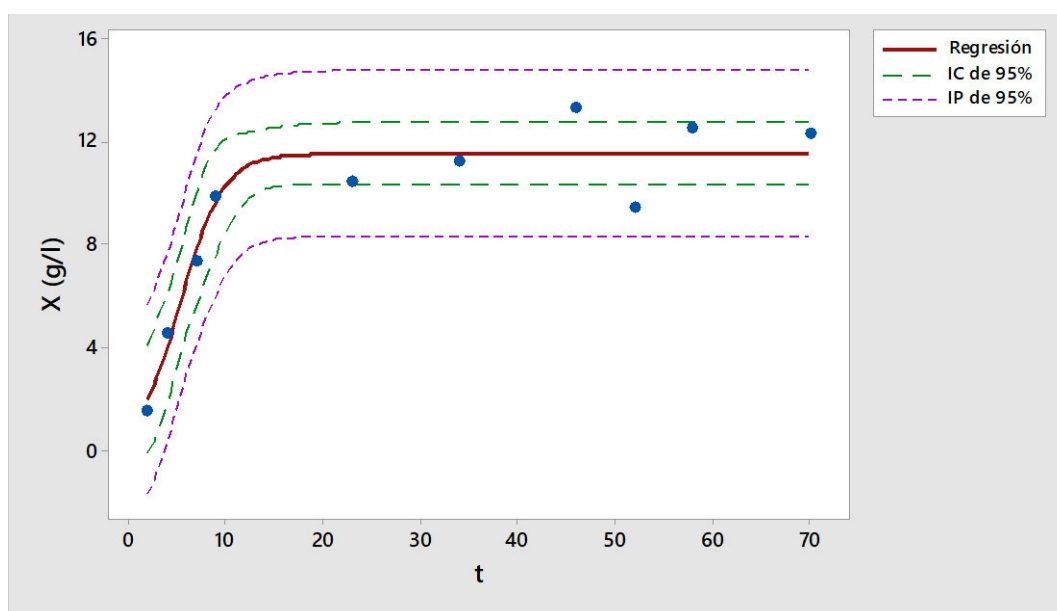
D.10 Gráficas de ajuste para el modelo experimental (escenario 1)



D.11 Gráficas de ajuste para el modelo experimental (escenario 2)

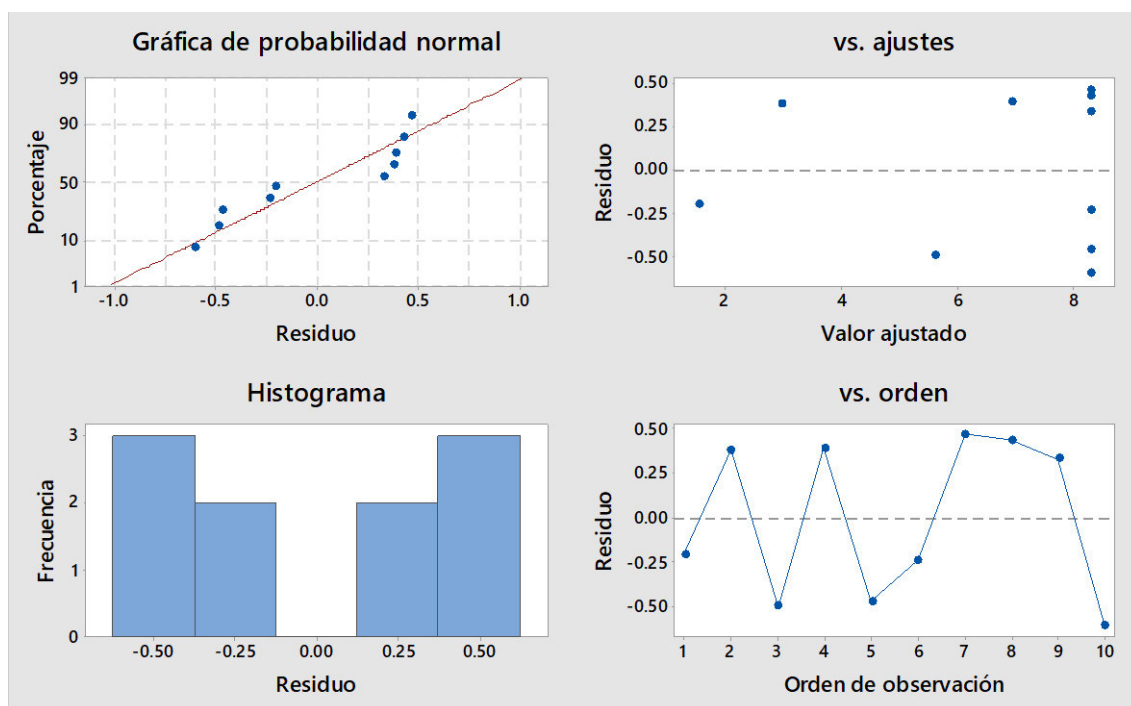


D.12 Gráficas de ajuste para el modelo experimental (escenario 3)

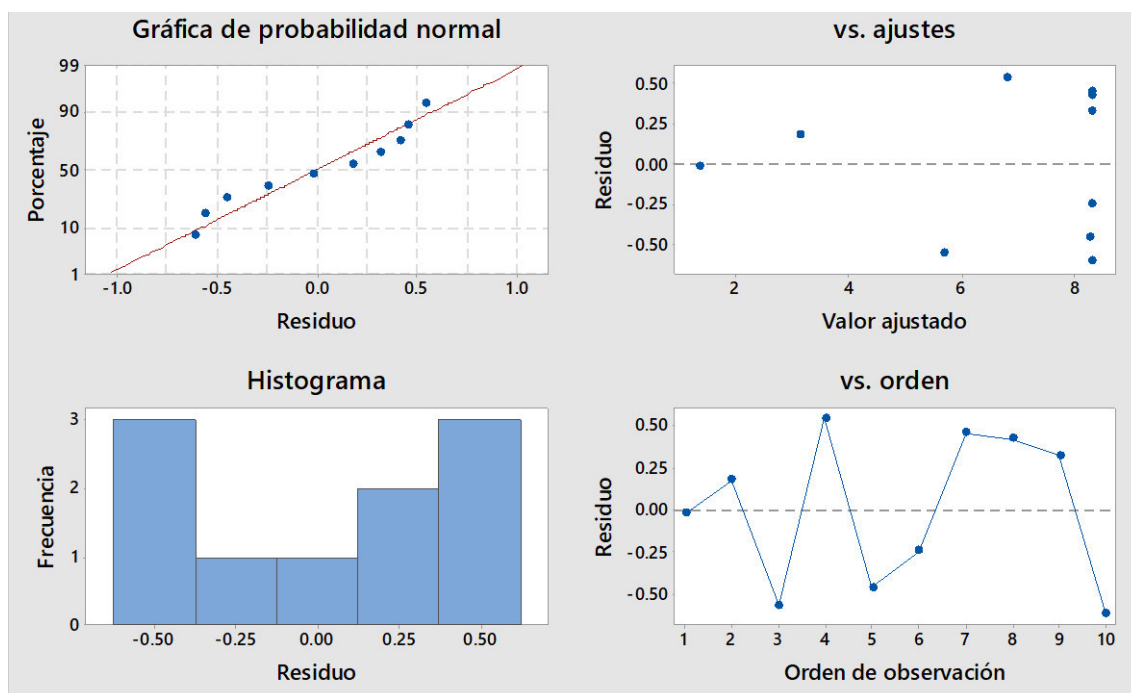


ANEXO E. Residuos del ajuste de los datos experimentales del escenario 1 utilizando MiniTab.

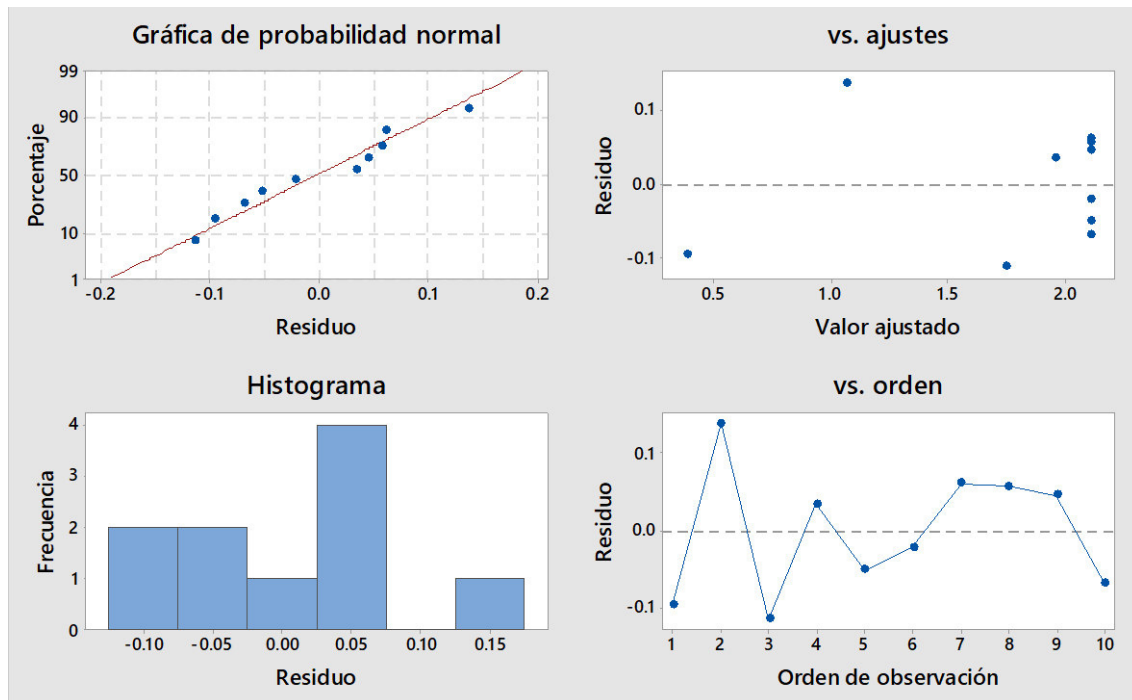
E.1 Gráficas de probabilidad normal y de residuos procedentes del ajuste de los datos experimentales empleando el modelo logístico.



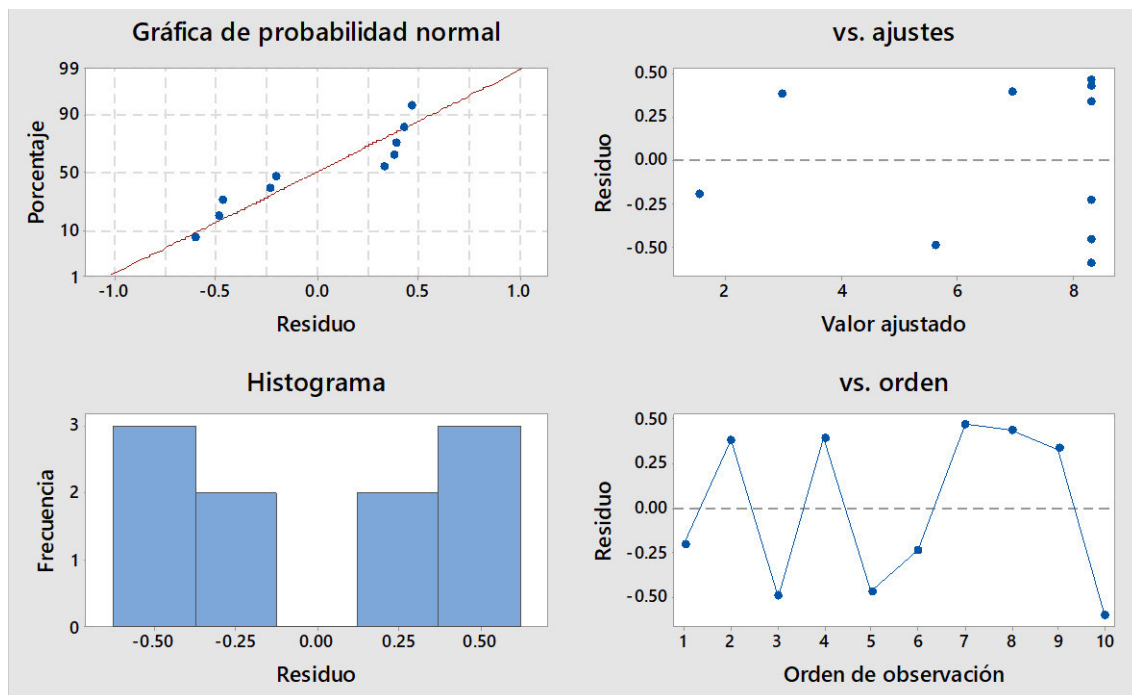
E.2 Gráficas de probabilidad normal y de residuos procedentes del ajuste de los datos experimentales empleando el modelo de Gompertz.



E.3 Gráficas de probabilidad normal y de residuos procedentes del ajuste de los datos experimentales empleando el modelo de Baranyi.

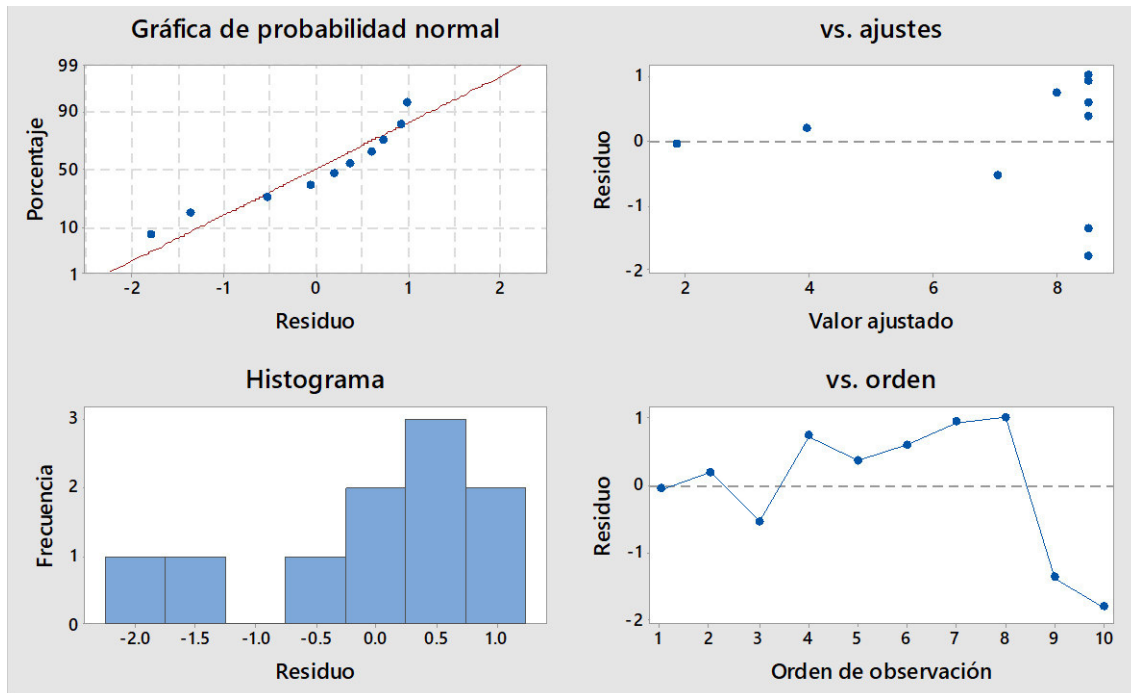


E.4 Gráficas de probabilidad normal y de residuos procedentes del ajuste de los datos experimentales empleando el modelo experimental.

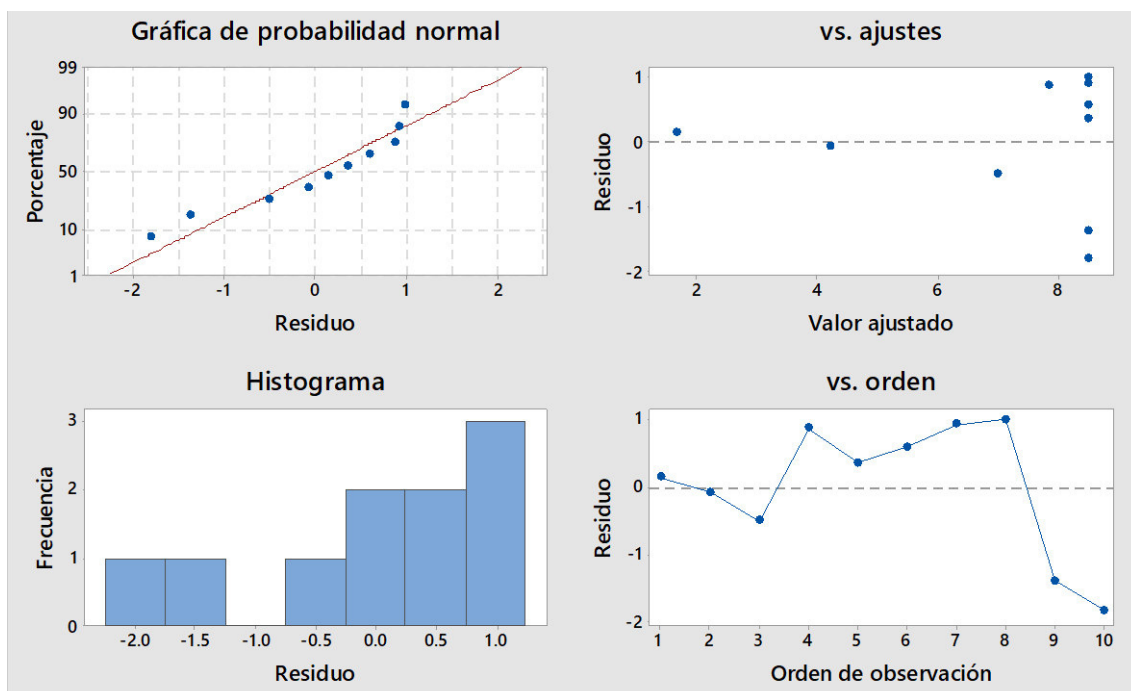


ANEXO F. Residuos del ajuste de los datos experimentales del escenario 2 utilizando MiniTab.

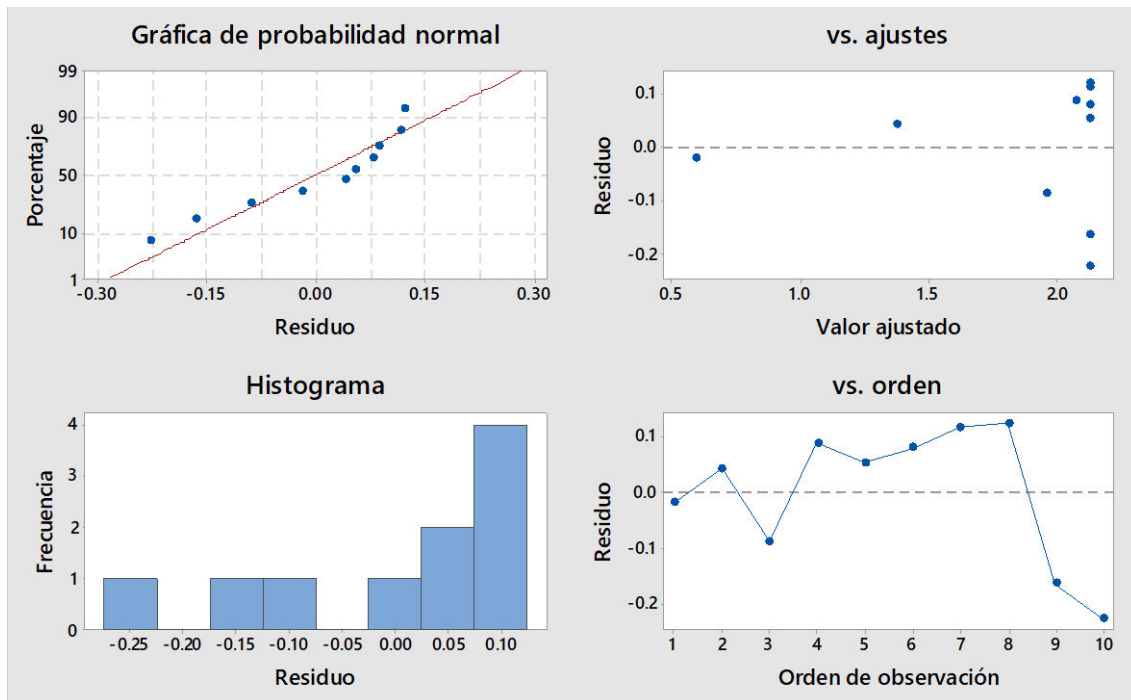
F.1 Gráficas de probabilidad normal y de residuos procedentes del ajuste de los datos experimentales empleando el modelo logístico.



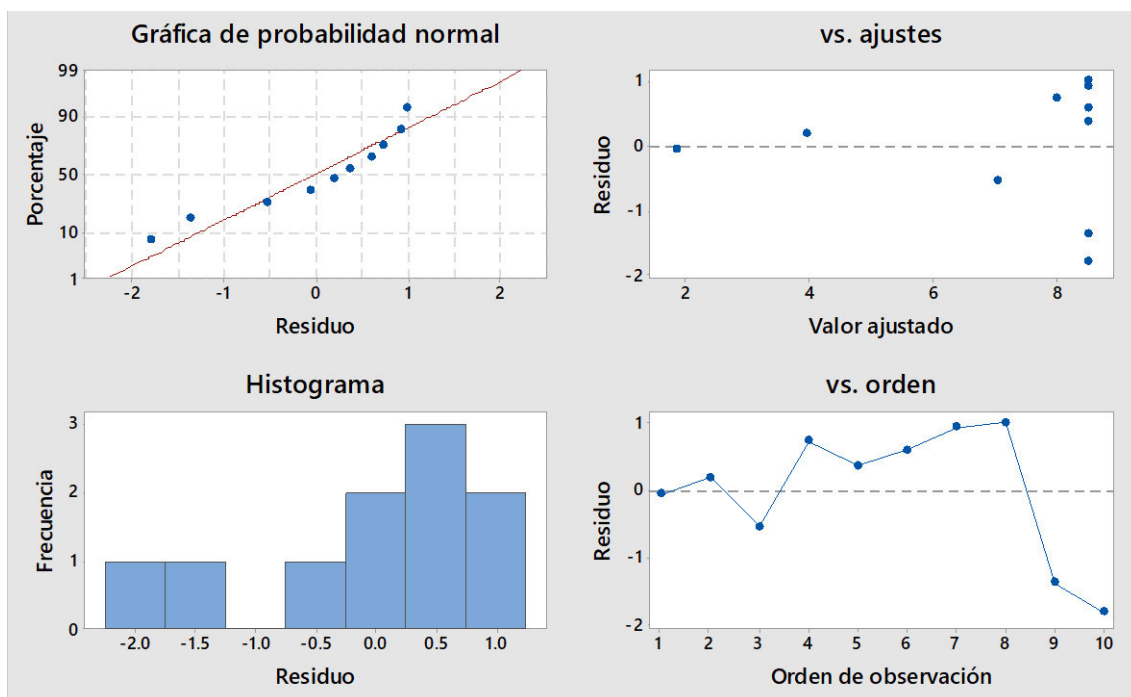
F.2 Gráficas de probabilidad normal y de residuos procedentes del ajuste de los datos experimentales empleando el modelo de Gompertz.



F.3 Gráficas de probabilidad normal y de residuos procedentes del ajuste de los datos experimentales empleando el modelo de Baranyi.

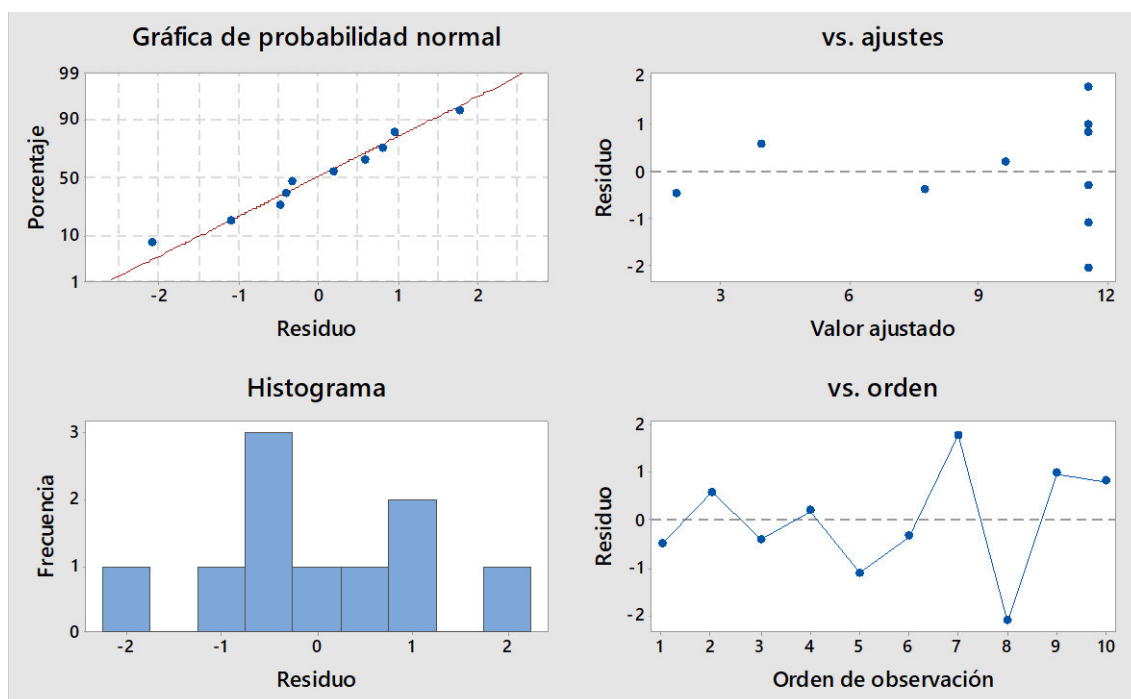


F.4 Gráficas de probabilidad normal y de residuos procedentes del ajuste de los datos experimentales empleando el modelo de Baranyi.

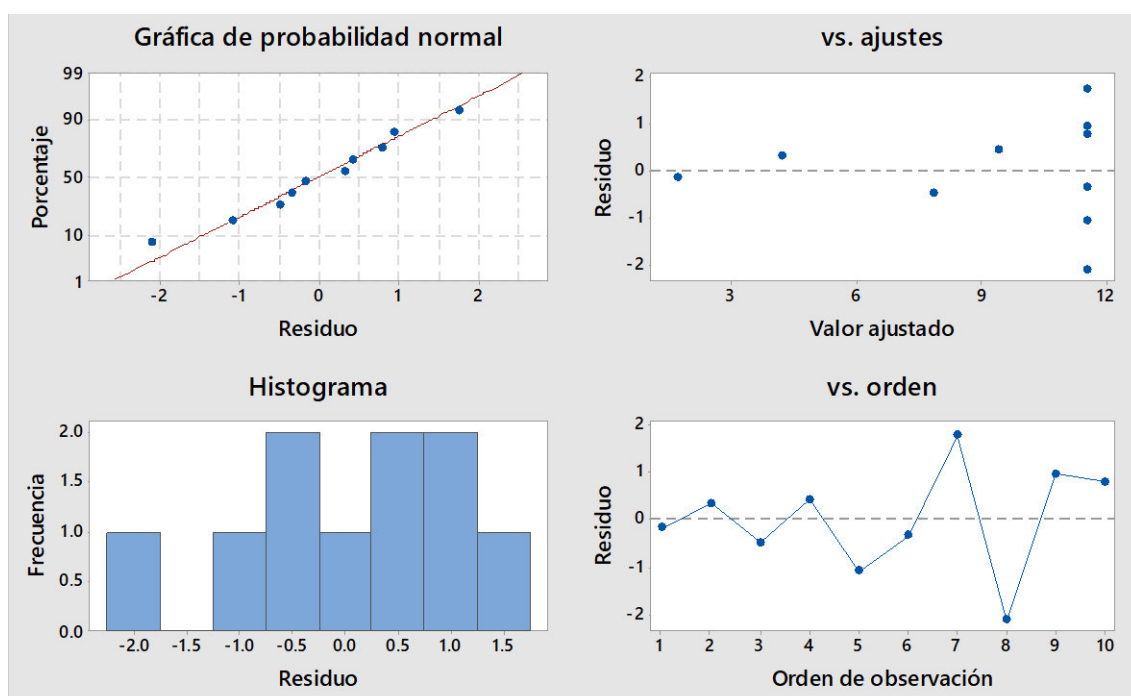


ANEXO G. Residuos del ajuste de los datos experimentales del escenario 3 utilizando MiniTab.

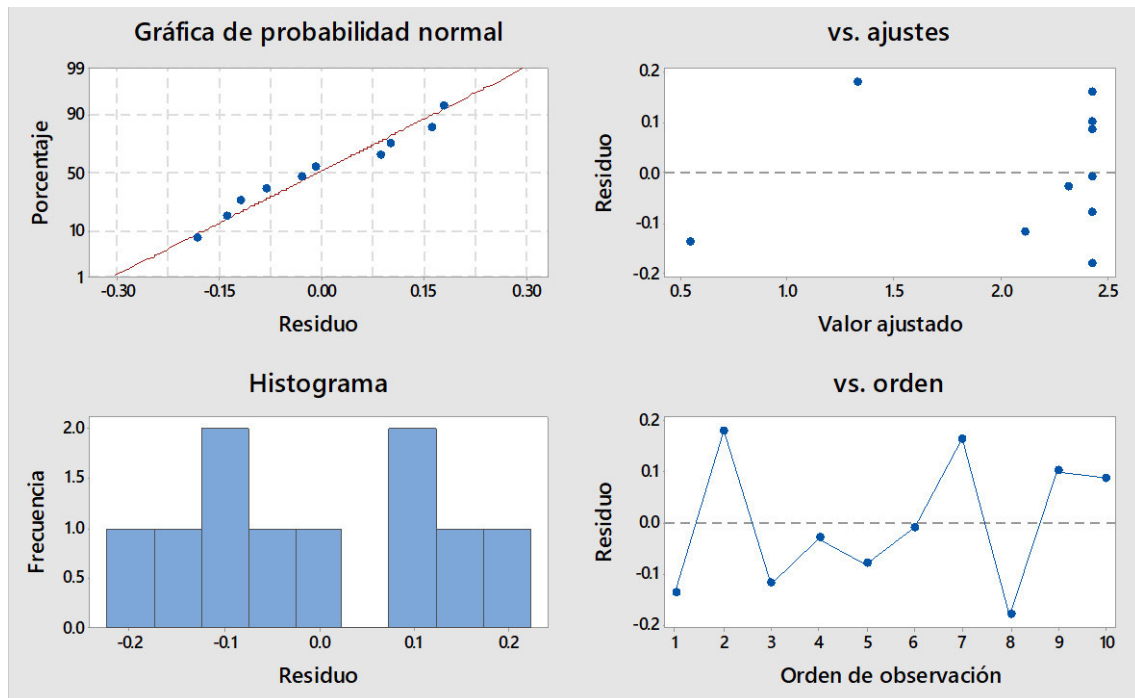
G.1 Gráficas de probabilidad normal y de residuos procedentes del ajuste de los datos experimentales empleando el modelo logístico.



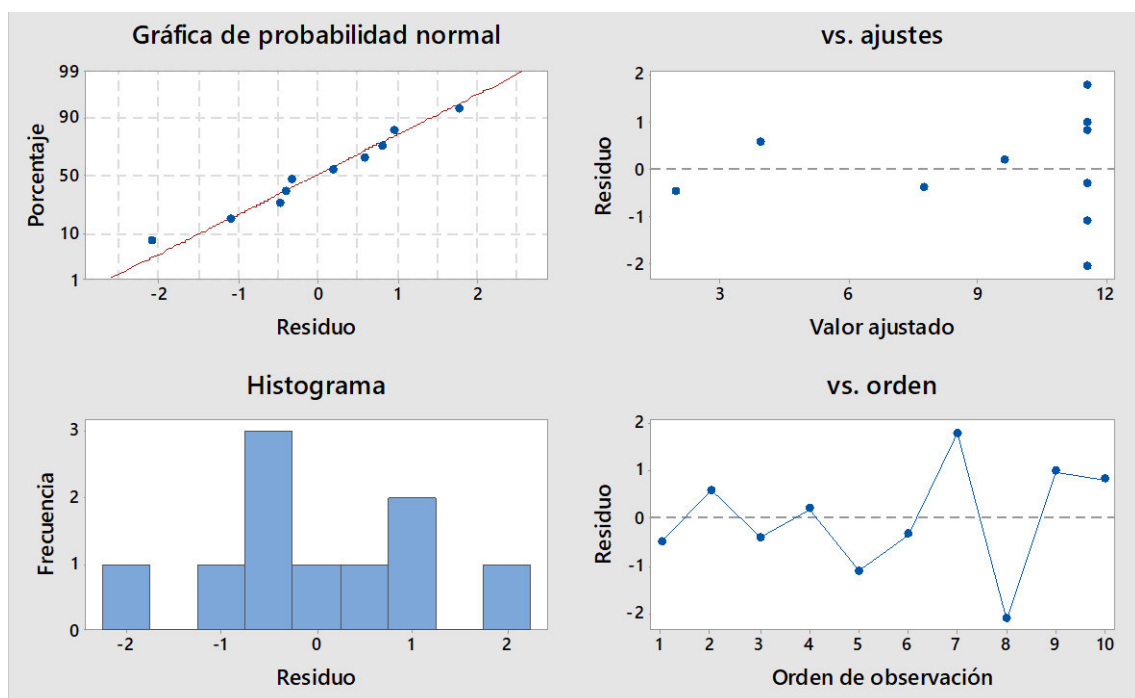
G.2 Gráficas de probabilidad normal y de residuos procedentes del ajuste de los datos experimentales empleando el modelo de Gompertz.



G.3 Gráficas de probabilidad normal y de residuos procedentes del ajuste de los datos experimentales empleando el modelo de Baranyi.



G.4 Gráficas de probabilidad normal y de residuos procedentes del ajuste de los datos experimentales empleando el modelo experimental.



ANEXO H. Valores de los parámetros estadísticos resultantes del ajuste al modelo logístico¹⁰ obtenidos en MiniTab

H.1 Cuadro de errores en las estimaciones para el ajuste de los datos en el escenario 1.

Parámetro	Estimar	EE de estimación	IC de 95 %
Theta1	8.30366	0.201778	(7.82836; 8.78036)
Theta2	0.37087	0.40649	(-0.46752; 1.46602)
Theta3	0.4448	0.071583	(0.30017; 0.63721)

H.2 Cuadro de errores en las estimaciones para el ajuste de los datos en el escenario 2.

Parámetro	Estimar	EE de estimación	IC de 95 %
Theta1	8.50537	0.436215	(7.49503; 9.53804)
Theta2	0.43655	0.9613	(-1.28847; *)
Theta3	0.57279	0.219429	(0.23586; *)

H.3 Cuadro de errores en las estimaciones para el ajuste de los datos en el escenario 3.

Parámetro	Estimar	EE de estimación	IC de 95 %
Theta1	11.536	0.513773	(10.3232; 12.7545)
Theta2	0.4904	0.772103	(-0.9914; 3.0572)
Theta3	0.4571	0.13378	(0.2002; 0.9226)

H.4 Matriz de correlación para estimaciones de parámetros para el escenario 1.

	Theta1	Theta2
Theta2	-0.046655	-
Theta3	-0.262922	0.907841

H.5 Matriz de correlación para estimaciones de parámetros para el escenario 2.

	Theta1	Theta2
Theta2	-0.141142	-
Theta3	-0.306923	0.907242

¹⁰ En el programa MiniTab, el modelo logístico fue procesado de la siguiente forma:

$$X = \frac{Theta1}{1 + \exp(Theta2 - Theta3(t) + 2)}$$

H.6 Matriz de correlación para estimaciones de parámetros para el escenario 3.

	Theta1	Theta2
Theta2	-0.048878	-
Theta3	-0.212451	0.912439

H.7 Resumen de parámetros estadísticos para el escenario 1.

Iteraciones	25
SSE final	1.72263
DFE	7
MSE	0.246091
S	0.46075

H.8 Resumen de parámetros estadísticos para el escenario 2.

Iteraciones	40
SSE final	8.33277
DFE	7
MSE	1.1904
S	1.09105

H.9 Resumen de parámetros estadísticos para el escenario 3.

Iteraciones	37
SSE final	11.1736
DFE	7
MSE	1.59623
S	1.26342

ANEXO I. Valores de los parámetros estadísticos resultantes del ajuste al modelo de Gompertz¹¹ obtenidos en MiniTab

I.1 Cuadro de errores en las estimaciones para el ajuste de los datos en el escenario 1.

Parámetro	Estimar	EE de estimación	IC de 95 %
Theta1	8.31248	0.205752	(7.82843; 8.79928)
Theta2	0.22195	0.24546	(-0.30608; 0.89085)
Theta3	0.31355	0.050655	(0.20917; 0.45477)

I.2 Cuadro de errores en las estimaciones para el ajuste de los datos en el escenario 2.

Parámetro	Estimar	EE de estimación	IC de 95 %
Theta1	8.51641	0.442408	(7.49598; 9.55971)
Theta2	0.35778	0.612803	(-0.81109; *)
Theta3	0.42735	0.159975	(0.17778; *)

I.3 Cuadro de errores en las estimaciones para el ajuste de los datos en el escenario 3.

Parámetro	Estimar	EE de estimación	IC de 95 %
Theta1	11.5525	0.510593	(10.3496; 12.7677)
Theta2	0.2984	0.451375	(-0.6357; 1.8618)
Theta3	0.3207	0.091453	(0.1389; 0.6683)

I.4 Matriz de correlación para estimaciones de parámetros para el escenario 1.

	Theta1	Theta2
Theta2	-0.104356	-
Theta3	-0.283813	0.885791

I.5 Matriz de correlación para estimaciones de parámetros para el escenario 2.

	Theta1	Theta2
Theta2	-0.181726	-
Theta3	-0.3458	0.897096

¹¹ En el programa MiniTab, el modelo de Gompertz fue procesado de la siguiente forma:

$$X = \text{Theta1} \left\{ \exp \left[-\exp(\text{Theta2} - \text{Theta3}(t) + 1) \right] \right\}$$

I.6 Matriz de correlación para estimaciones de parámetros para el escenario 3.

	Theta1	Theta2
Theta2	-0.107021	-
Theta3	-0.280048	0.890682

I.7 Resumen de parámetros estadísticos para el escenario 1.

Iteraciones	34
SSE final	1.77258
DFE	7
MSE	0.253225
S	0.503215

I.8 Resumen de parámetros estadísticos para el escenario 2.

Iteraciones	79
SSE final	8.51016
DFE	7
MSE	1.21574
S	1.1026

I.9 Resumen de parámetros estadísticos para el escenario 3.

Iteraciones	32
SSE final	10.9285
DFE	7
MSE	1.56121
S	1.24949

ANEXO J. Valores de los parámetros estadísticos resultantes del ajuste al modelo de Baranyi¹² obtenidos en MiniTab

J.1 Cuadro de errores en las estimaciones para el ajuste de los datos en el escenario 1.

Parámetro	Estimar	EE de estimación	IC de 95 %
Theta1	2.11052	0.037088	(2.02197; 2.19939)
Theta2	0.25085	0.389115	(-0.66548; 1.27858)
Theta3	0.4915	0.081912	(0.31713; 0.74976)
Theta4	-0.34347	*	(*; *)

J.2 Cuadro de errores en las estimaciones para el ajuste de los datos en el escenario 2.

Parámetro	Estimar	EE de estimación	IC de 95 %
Theta1	2.12926	0.054054	(2.00312; 2.25926)
Theta2	0.12914	0.686379	(-1.41950; 1.99656)
Theta3	0.60699	0.181505	(0.27783; 1.19497)
Theta4	-0.3797	*	(*; *)

J.3 Cuadro de errores en las estimaciones para el ajuste de los datos en el escenario 3.

Parámetro	Estimar	EE de estimación	IC de 95 %
Theta1	2.42604	0.058317	(2.28326; 2.56917)
Theta2	0.59362	0.614274	(-0.86033; 3.08537)
Theta3	0.58515	0.140355	(0.29675; 1.30284)
Theta4	-0.16875	*	(*; *)

J.4 Matriz de correlación para estimaciones de parámetros para el escenario 1.

	Theta1	Theta2	Theta3
Theta2	-0.22469		*
Theta3	-0.313301	0.949718	*
Theta4	*	*	*

¹² En el programa MiniTab, el modelo de Baranyi fue procesado de la siguiente forma:

$$Y = \text{Theta1} + \ln \left[\frac{-1 + \exp(\text{Theta2}) + \exp(\text{Theta3} \cdot x)}{-1 + \exp(\text{Theta3} \cdot x) + \exp(\text{Theta2} + \text{Theta1} - \text{Theta4})} \right]$$

J.5 Matriz de correlación para estimaciones de parámetros para el escenario 2.

	Theta1	Theta2	Theta3
Theta2	-0.270284		*
Theta3	-0.343363	0.959286	*
Theta4	*	*	*

J.6 Matriz de correlación para estimaciones de parámetros para el escenario 3.

	Theta1	Theta2	Theta3
Theta2	-0.23999		*
Theta3	-0.321943	0.949873	*
Theta4	*	*	*

J.7 Resumen de parámetros estadísticos para el escenario 1.

Iteraciones	16
SSE final	0.059243
DFE	7
MSE	0.0084633
S	0.0919961

J.8 Resumen de parámetros estadísticos para el escenario 2.

Iteraciones	17
SSE final	0.13346
DFE	7
MSE	0.0190657
S	0.138079

J.9 Resumen de parámetros estadísticos para el escenario 3.

Iteraciones	26
SSE final	0.149626
DFE	7
MSE	0.0213752
S	0.146202

ANEXO K. Valores de los parámetros estadísticos resultantes del ajuste al modelo de estudio¹³ obtenidos en MiniTab

K.1 Cuadro de errores en las estimaciones para el ajuste de los datos en el escenario 1.

Parámetro	Estimar	EE de estimación	IC de 95 %
Theta1	0.775556	0.316695	(0.258022; 1.79562)
Theta2	0.093399	0.037966	(0.031241; 0.21600)
Theta3	-0.444799	0.071583	(-0.637208; -0.30017)

K.2 Cuadro de errores en las estimaciones para el ajuste de los datos en el escenario 2.

Parámetro	Estimar	EE de estimación	IC de 95 %
Theta1	0.743899	0.721484	(*; 4.16281)
Theta2	0.087462	0.084077	(*; 0.49089)
Theta3	-0.572789	0.219429	(*; -0.23586)

K.3 Cuadro de errores en las estimaciones para el ajuste de los datos en el escenario 3.

Parámetro	Estimar	EE de estimación	IC de 95 %
Theta1	0.956077	0.741492	(0.072480; 4.21479)
Theta2	0.082878	0.06399	(0.006364; 0.36471)
Theta3	-0.457092	0.13378	(-0.922638; -0.20024)

K.4 Matriz de correlación para estimaciones de parámetros para el escenario 1.

	Theta1	Theta2
Theta2	0.998232	*
Theta3	0.916584	0.907841

K.5 Matriz de correlación para estimaciones de parámetros para el escenario 2.

	Theta1	Theta2
Theta2	0.998629	*
Theta3	0.915456	0.907242

¹³ En el programa MiniTab, el modelo de estudio fue procesado de la siguiente forma:

$$X = \frac{\text{Theta1}}{\text{Theta2} + \exp[\text{Theta3}(t)]}$$

K.6 Matriz de correlación para estimaciones de parámetros para el escenario 3.

	Theta1	Theta2
Theta2	0.998354	*
Theta3	0.920576	0.912439

K.7 Resumen de parámetros estadísticos para el escenario 1.

Iteraciones	25
SSE final	1.72263
DFE	7
MSE	0.246091
S	0.496075

K.8 Resumen de parámetros estadísticos para el escenario 2.

Iteraciones	33
SSE final	8.33277
DFE	7
MSE	1.1904
S	1.09105

K.9 Resumen de parámetros estadísticos para el escenario 3.

Iteraciones	17
SSE final	11.1736
DFE	7
MSE	1.59623
S	1.26342

ANEXO L. Desarrollo matemático del modelo Logístico.

Trinidad (2014) describe el procedimiento matemático para la obtención del modelo logístico como sigue:

$$\frac{dN(t)}{dt} = (b_1 - d_1)N(t) \quad (\text{A.L. 1})$$

$$\frac{dN(t)}{dt} = \left[(b - aN(t)) - (d + cN(t)) \right] N(t) \quad (\text{A.L. 2})$$

$$\frac{dN(t)}{dt} = (b - d)N(t) \left[1 - \frac{(a + c)}{(b - d)} N(t) \right] \quad (\text{A.L. 3})$$

Considerando $K = b - d$ y $A = \frac{(b - d)}{(a + c)}$

$$\frac{dN(t)}{dt} = KN(t) \left[1 - \frac{N(t)}{A} \right] \quad (\text{A.L. 4})$$

$$\int \frac{1}{N(t) \left(1 - \frac{N(t)}{A} \right)} dN(t) = \int K dt$$

$$W = N(t) \quad (\text{A.L. 5})$$

$$dW = \frac{dN(t)}{dt} dt$$

Sustituyendo (A.L. 5) en la integral:

$$\int \frac{dW}{W \left(1 - \frac{W}{A} \right)} = \int K dt$$

Para resolver la integral del lado izquierdo se utilizará el método de fracciones parciales:

$$\frac{1}{W \left(1 - \frac{W}{A} \right)} = \frac{P}{W} + \frac{Q}{1 - \frac{W}{A}} \rightarrow P \left(1 - \frac{W}{A} \right) + QW = 1$$

$$\left(Q - \frac{P}{A} \right) W + P = 1 \rightarrow P = 1 \quad \left(Q - \frac{P}{A} \right) = 0$$

$$\rightarrow P=1 \quad \text{y} \quad Q=\frac{1}{A}$$

$$\int \frac{dW}{W\left(1-\frac{W}{A}\right)} = \int \left(\frac{1}{W} + \frac{\frac{1}{A}}{1-\frac{W}{A}} \right) dW = \int \frac{dW}{W} + \int \frac{\frac{1}{A}}{1-\frac{W}{A}}$$

Cambiando de variable y efectuando sustituciones tenemos:

$$\int \frac{dW}{W} + \int \frac{\frac{1}{A}}{1-\frac{W}{A}} = \ln\left(\frac{W}{A-W}\right) + C_1$$

Resolviendo la integral del lado derecho:

$$\int K dt = Kt + C_2$$

Finalmente se obtiene:

$$\ln\left(\frac{W}{A-W}\right) + C_1 = Kt + C_2 \quad (\text{A.L. 6})$$

$$\ln\left(\frac{W}{A-W}\right) = Kt + C_3 \quad (\text{A.L. 7})$$

Aplicando la función exponencial y retomando la nomenclatura inicial:

$$\frac{W}{A-W} = C_3 e^{Kt} \quad (\text{A.L. 8})$$

$$W = \frac{A}{\frac{1}{C_3 e^{Kt}} + 1} \quad (\text{A.L. 9})$$

Considerando $\frac{1}{C_3} = B$ y retomando la nomenclatura:

$$N(t) = \frac{A}{1 + B e^{-Kt}} \quad (\text{A.L. 10})$$

ANEXO M. Desarrollo matemático del modelo de Gompertz.

Trinidad (2014) describe el procedimiento matemático para la obtención del modelo de Gompertz como sigue:

$$\frac{dN(t)}{dt} = KN(t) \ln \left(\frac{A}{N(t)} \right) \quad (\text{A.M. 1})$$

A priori, se debe garantizar la continuidad de la función:

$$f(N(t)) = N(t) \ln \left(\frac{A}{N(t)} \right) = \frac{\ln \left(\frac{A}{N(t)} \right)}{\frac{1}{N(t)}} = \frac{\ln(A) - \ln(N(t))}{\frac{1}{N(t)}}$$

Aplicando la regla de L'Hôpital obtenemos:

$$\lim_{N(t) \rightarrow 0} f(N(t)) = \lim_{N(t) \rightarrow 0} \frac{(\ln(A) - \ln(N(t)))'}{\left(\frac{1}{N(t)}\right)'} = \lim_{N(t) \rightarrow 0} \frac{\frac{-1}{N(t)}}{\frac{-1}{N(t)^2}} = 0$$

Así queda demostrado que no existe indeterminación en ese punto.

$$\frac{1}{N(t) \ln \left(\frac{A}{N(t)} \right)} \frac{dN(t)}{dt} = K \quad (\text{A.M. 2})$$

$$\int \frac{1}{N(t) \ln \left(\frac{A}{N(t)} \right)} \frac{dN(t)}{dt} = \int K dt$$

Cambiando de variable:

$$W = N(t) \quad (\text{A.M. 3})$$

$$dW = \frac{dN(t)}{dt} dt$$

Sustituyendo (A.M. 3) en la integral:

$$\int \frac{dW}{W \ln\left(\frac{A}{W}\right)} = \int K dt$$

Aplicando nuevamente un cambio de variable:

$$U = \ln\left(\frac{A}{W}\right) \quad (\text{A.M. 4})$$

$$dU = -\frac{1}{W} dW$$

Reemplazando (A.M. 4) en la integral:

$$-\int \frac{dU}{U} = \int K dt$$

$$-\ln(U) + C_1 = Kt$$

$$-\ln\left(\ln\left(\frac{A}{W}\right)\right) + C_1 = Kt$$

$$\ln\left(\ln\left(\frac{A}{W}\right)\right) = -Kt + C_1$$

$$\ln\left(\frac{A}{W}\right) = C_2 e^{-Kt}$$

$$\frac{A}{W} = e^{Be^{-Kt}} \quad (\text{A.M. 5})$$

Despejando y reemplazando W por N(t):

$$N(t) = Ae^{-Be^{-Kt}} \quad (\text{A.M. 6})$$